



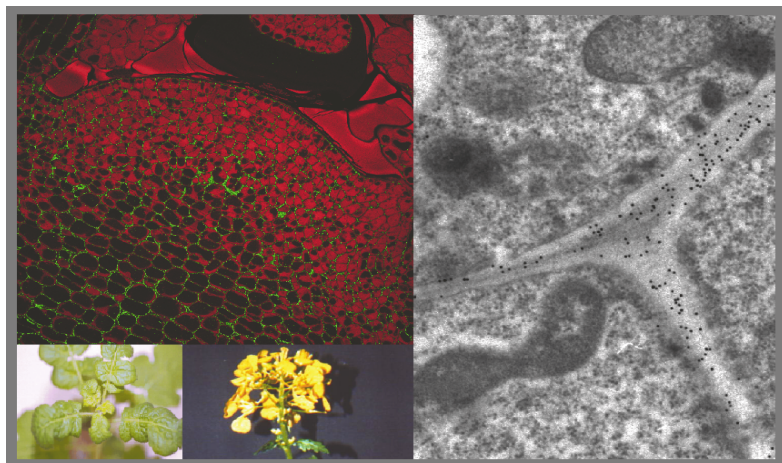
**FUNDP**

**Faculté des Sciences**

**DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE**

Unité de Recherches en Biologie cellulaire Végétale

## **ÉTUDE IMMUNOCYTOCHIMIQUE DES PECTINES DU MÉRISTÈME DE *SINAPIS ALBA* L. ET DE LEURS MODIFICATIONS LORS DE LA TRANSITION FLORALE**



**Dissertation présentée par  
Stéphanie Sobry**  
en vue de l'obtention du grade  
de Docteur en Sciences

**2005**





---

## **FUNDP**

### **Faculté des Sciences**

#### **DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE**

Unité de Recherches en Biologie cellulaire Végétale

Rue de Bruxelles, 61

B-5000 Namur

Tél. +32(0)81724370

Fax +32(0)81724382

e-mail : [pierre.vancutsem@fundp.ac.be](mailto:pierre.vancutsem@fundp.ac.be)

Site web : <http://www.fundp.ac.be/sciences/biologie/urbv/>

## **ÉTUDE IMMUNOCYTOCHIMIQUE DES PECTINES DU MÉRISTÈME DE *SINAPIS ALBA* L. ET DE LEURS MODIFICATIONS LORS DE LA TRANSITION FLORALE**

**Dissertation présentée par**  
**Stéphanie Sobry**  
en vue de l'obtention du grade  
de Docteur en Sciences  
(décembre 2004)

### **Composition du jury :**

- Prof. Pierre Van Cutsem (Promoteur)
- Prof. Johan Messiaen
- Prof. Yves Poumay
- Prof. Georges Bernier
- Prof. Jean-Marie Kinet

© Presses universitaires de Namur & Stéphanie Sobry  
Rempart de la Vierge, 13  
B - 5000 Namur (Belgique)

Toute reproduction d'un extrait quelconque de ce livre,  
hors des limites restrictives prévues par la loi,  
par quelque procédé que ce soit, et notamment par photocopie ou  
scanner, est strictement interdite pour tous pays.

Imprimé en Belgique

ISBN: 2-87037-473-9  
Dépôt légal: D/2004/1881/47



*A mon Parrain, qui aurait tant  
voulu voir ce travail...  
J'espère que la vie lui réserve  
encore de beaux moments,  
malgré l'obscurité...*



*Au terme de ce doctorat, je tiens tout d'abord à remercier Monsieur le Professeur P. Van Cutsem pour la confiance qu'il m'a accordée en m'accueillant au sein du laboratoire. Je lui suis très reconnaissante pour sa compréhension quant au prolongement de la rédaction ainsi que pour son soutien et les nombreuses discussions qui m'ont permis d'aboutir. De même, un grand merci à Monsieur le Professeur J. Messiaen pour ses conseils judicieux tout au long de ce travail et pour sa participation au jury.*

*Mes remerciements également à Monsieur le Professeur G. Bernier pour avoir accepté de faire partie du jury ainsi que pour ses conseils avisés, et à Messieurs les Professeurs J-M. Kinet et Y. Poumay pour leur participation au jury.*

*Toute ma gratitude à Madame le Docteur A. Havelange chez qui j'ai pris goût à l'univers passionnant de la recherche scientifique lors de mes tout premiers pas dans ce domaine ainsi que pour son aide indispensable lors des prélèvements, mais aussi à Madame le Docteur F. Liners pour ses nombreux conseils, ainsi que pour son soutien indispensable.*

*Pour réaliser cette thèse, j'ai bénéficié de deux mandats F.R.I.A., ainsi que d'un prolongement de six mois des Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix, je les en remercie beaucoup.*

*Je voudrais également remercier tout le personnel de l'Unité Interfacultaire de Microscopie Electronique. Et plus spécialement C. Devignon qui a réalisé les coupes. En plus de son ouvrage de grande qualité, son soutien moral et les nombreuses discussions sur la vie de tous les jours ont été d'un précieux secours. Merci aussi à C. Demazy, qui m'a enseigné les techniques de marquage et pour sa participation aux analyses préliminaires, ainsi qu'à R. Deom pour ses nombreux conseils concernant la microscopie.*

*Tous mes remerciements aussi aux membres du service des Cultures Expérimentales de l'Institut de Botanique (ULg) ainsi qu'à tous les chercheurs et techniciens de l'URBV. Particulièrement à P. Cambier pour sa bonne humeur, N. Dauchot que j'ai eu beaucoup de plaisir à superviser lors de son mémoire de licence, F. Lonnoy pour son aide informatique notamment et L. Le pour l'apprentissage des techniques de biologie moléculaire. Un grand merci aussi au Dr S. Ormenese pour son intérêt et les coups de pouce biblio...*

*J'exprime une reconnaissance toute particulière au Dr C. Winand pour son soutien sans lequel je n'y serais jamais parvenue et à P. De Windt pour les relectures critiques et constructives...et vu la complexité du sujet, ce n'était pas une sinécure... !*

*Je ne voudrais pas terminer sans remercier tous mes proches, ma famille et mes amis, qui m'ont soutenue et encouragée tout au long de ce doctorat et qui sont restés présents au cours de ces dernières années particulièrement difficiles. Et spécialement à mes parents, sans leur soutien financier, en plus de tout le reste, cette thèse n'aurait jamais pu voir le jour.*

*Mille mercis à vous tous pour vos oreilles attentives...la pectine vous ne l'oublierez pas de sitôt, vos coups de pouce, vos remontrances lorsque j'avais envie de baisser les bras, vos petits messages pour m'encourager ou me remonter le moral, sans vous je me serais sentie bien seule.*

*Enfin, un clin d'œil à Stitch qui a assisté sans comprendre à tous les moments difficiles...encore un peu de patience... le plaisir de se délasser les pattes dans la nature sera bientôt à ta portée !*

# Table des matières

---

Liste des abréviations

**Introduction et objectifs du travail**..... 19

## **Relevé de la littérature**

**Les pectines et la paroi cellulaire végétale**..... 27

■ **Structure de la paroi des dicotylédones** ..... 30

**Structure de la paroi primaire – modèle de type I** ..... 32

● Réseau de cellulose-xyloglucane

● Réseau pectique ..... 34

□ Structure primaire des polymères pectiques

□ Modèles de la structure macromoléculaire  
de la pectine ..... 37

*Liaisons entre les macromolécules pectiques  
et formation de réseaux*

○ Gels calciques – liaisons anioniques ..... 38

○ Dimérisation du RG II – Borate-diol  
esters ..... 40

○ Uronyl esters et autres liens ..... 41

*Vers un nouveau modèle de pectine dans la  
paroi* ..... 43

● Réseau protéique ..... 48

■ **Composition et localisation des pectines lors du  
développement**..... 49

**Homogalacturonanes**..... 52

● Variations du degré d'estérification ..... 53

● Formation de gels et intégrité de la paroi ..... 56

□ Gels calciques

□ Autres gels ..... 58

□ Facteurs favorisant la séparation cellulaire ..... 59

● Rôle des PME – le cas des zones de jonction  
intercellulaires ..... 60

**Chaînes latérales du RG I** ..... 64

**Les pectine méthylestérases**..... 67

■ **Structure de la protéine**..... 69

■ **Pré-pro-enzymes**

**Structure tridimensionnelle de la protéine mature** ..... 72

|                                                  |    |
|--------------------------------------------------|----|
| ■ Les PME, une famille multigénique .....        | 73 |
| ■ Propriétés des PME.....                        | 76 |
| Physico-chimiques                                |    |
| Enzymatiques .....                               | 77 |
| ● Mode d'action                                  |    |
| ● Régulation de l'activité PME.....              | 78 |
| □ Influence du pH .....                          | 79 |
| □ Influence des cations .....                    | 80 |
| □ Inhibiteurs de l'activité PME.....             | 81 |
| ■ Localisation des PME et de leur activité ..... | 82 |
| ○ Niveau cellulaire.....                         | 83 |
| ○ Niveau tissulaire                              |    |

## Présentation du système expérimental :

|                                                                          |     |
|--------------------------------------------------------------------------|-----|
| la plante modèle de floraison – <i>Sinapis alba</i> .....                | 85  |
| ■ Paramètres de croissance du méristème apical .....                     | 87  |
| ■ Transformations au sein du SAM au cours de la transition florale ..... | 89  |
| Prolifération cellulaire                                                 |     |
| Fréquence des plasmodesmes et communications symplasmiques .....         | 90  |
| ■ Le stimulus floral de nature multifactorielle .....                    | 94  |
| Saccharose                                                               |     |
| Cytokinines .....                                                        | 95  |
| Autres composants .....                                                  | 96  |
| “Shoot-to-root-to-shoot physiological loop” .....                        | 98  |
| ■ Conclusions .....                                                      | 100 |

## Résultats et discussions

|                                                                                                         |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Détection immunocytochimique des pectines.....                                                          | 103 |
| ■ Partie 1. Nature et localisation des pectines du méristème                                            |     |
| Immunocytochemistry of pectins in shoot apical meristems: Consequences for intercellular adhesion ..... | 109 |
| Abstract                                                                                                |     |
| Keywords .....                                                                                          | 110 |
| Abbreviations                                                                                           |     |
| Introduction                                                                                            |     |
| Materials and methods .....                                                                             | 111 |

|                                                                                                                                                                                                                |            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Results .....                                                                                                                                                                                                  | 115        |
| Discussion .....                                                                                                                                                                                               | 120        |
| Conclusion .....                                                                                                                                                                                               | 125        |
| Acknowledgements                                                                                                                                                                                               |            |
| References                                                                                                                                                                                                     |            |
| <b>■ Partie 2. Modification des pectines au cours de la transition florale</b>                                                                                                                                 |            |
| <b>Immunolocalization of esterified pectins in the apex of the long-day plant <i>Sinapis alba</i> L. at floral transition: The pectin content drop dramatically in the first hours of this transition.....</b> | <b>129</b> |
| Abstract                                                                                                                                                                                                       |            |
| Keywords .....                                                                                                                                                                                                 | 130        |
| Abbreviations                                                                                                                                                                                                  |            |
| Introduction                                                                                                                                                                                                   |            |
| Materials and methods .....                                                                                                                                                                                    | 132        |
| Results .....                                                                                                                                                                                                  | 137        |
| Discussion .....                                                                                                                                                                                               | 142        |
| Conclusion .....                                                                                                                                                                                               | 149        |
| Acknowledgements .....                                                                                                                                                                                         | 150        |
| References                                                                                                                                                                                                     |            |
| <b>■ Partie 3. Comparaison des différentes zones de l'apex</b>                                                                                                                                                 |            |
| <b>Méthode d'analyse des images</b> .....                                                                                                                                                                      | <b>155</b> |
| ● Détermination des zones à comparer .....                                                                                                                                                                     | 156        |
| <b>Résultats</b> .....                                                                                                                                                                                         | <b>158</b> |
| ● Estimation de la surface des parois.....                                                                                                                                                                     | 159        |
| ● Comparaisons de zone à zone.....                                                                                                                                                                             | 162        |
| □ Entre ZM et ZNM.....                                                                                                                                                                                         | 163        |
| <i>Coupes non désestérifiées</i>                                                                                                                                                                               |            |
| <i>Coupes désestérifiées à la PME</i> .....                                                                                                                                                                    | 164        |
| □ A l'intérieur de la ZM .....                                                                                                                                                                                 | 165        |
| <i>L1,L2 et L3+M</i>                                                                                                                                                                                           |            |
| <i>ZP et ZC</i> .....                                                                                                                                                                                          | 166        |
| <b>Discussion générale</b> .....                                                                                                                                                                               | <b>168</b> |
| <b>Production et caractérisation d'un polysérum contre les PME .....</b>                                                                                                                                       | <b>175</b> |
| <b>Matériels et méthodes</b> .....                                                                                                                                                                             | <b>178</b> |

|                                                                                   |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----|
| ■ Résultats .....                                                                 | 188 |
| <b>Clonage d'une zone conservée de PME de <i>Sinapis</i></b>                      |     |
| ● Clonage dans pMOS (ou pCRII)                                                    |     |
| ● Clonage dans le vecteur d'expression : pET-17b .....                            | 189 |
| ● Expression des protéines SaPME .....                                            | 191 |
| ● Courbe d'expression de l'insert                                                 |     |
| ● Purification sur colonne T7tag .....                                            | 192 |
| <b>Production des polysérums anti-PME</b> .....                                   | 193 |
| ● Purification des protéines SaPME et immunisation .....                          | 194 |
| ● Caractérisation des sérums .....                                                | 196 |
| □ Epuisement et inhibition .....                                                  | 199 |
| □ Détection de PME sur des extraits de protéines totales de <i>Sinapis</i> .....  | 200 |
| <b>Utilisation des polysérums en immunocytochimie</b> .....                       | 202 |
| ■ Discussion générale et conclusions .....                                        | 207 |
| <b>Conclusions et perspectives</b> .....                                          | 213 |
| <b>Annexes</b>                                                                    |     |
| <b>1. Modèles de l'organisation du réseau de cellulose-XGs</b>                    |     |
| ■ « Sticky network model » .....                                                  | 225 |
| ■ « Multicoat model »                                                             |     |
| ■ « Stratified wall model » .....                                                 | 227 |
| <b>2. Méthode de mesure des intensités de marquage</b> .....                      | 229 |
| ■ Coupes désestérifiées à la PME – Comparaison ZM et ZNM                          |     |
| Détermination du seuil de bruit de fond .....                                     | 230 |
| Détermination du coefficient de surface de paroi estimé                           |     |
| Calcul du rapport ZM/ZNM .....                                                    | 232 |
| ■ Coupes non désestérifiées - Comparaisons ZM/ZNM et à l'intérieur de la ZM ..... | 233 |
| <b>3. Liste des posters présentés</b> .....                                       | 235 |
| <b>Bibliographie</b> .....                                                        | 239 |



# Liste des abréviations

---

[9R]iP : CK du groupe de l'isopentényladénine  
[9R]Z : CK du groupe de la zéatine  
ABA: acide abscissique  
AG I: arabinogalactane I  
AG II: arabinogalactane II  
AGP: arabinogalactan protein  
AIA : acide indole-3 acétique (= auxine)  
Amp: ampicilline  
Asp: asparagine  
At: *Arabidopsis thaliana*  
BA : CK benzyladénine  
BF: bruit de fond  
CK: cytokinine  
CO: cut-off  
Coef.  $S_{\text{parois}}$  : coefficient de surface des parois  
cw : cohesive wall  
DA : degré d'actétylestérification  
DE : degré d'estérification  
DFMO : difluorométhyl ornithine  
DM : degré de méthylestérification  
DP: degré de polymérisation  
DTT: dithiothreitol  
GA: acide gibbérellique  
GalA : acide galacturonique  
Gly: glycine  
GRP: glycine-rich protein  
HG: homogalacturonane  
HIS: hybridation *in situ*  
HRGP: hydroxyprolin-rich glycoprotein (= extensine)  
HRP: horse raddish peroxydase  
I : induit  
IgG: immunoglobuline G

IPTG: isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside

JC: jour court

JCFI : jour court à forte intensité

JL: jour long

jz : junction zone

LYCH : Lucifer Yellow CH

MAM: multiple attack mechanism

*nolac* : non organogenic callus with loosely attached cells

ODC : ornithine décarboxylase

OGA: oligogalacturonides

PA: phosphatase alkaline

PAE : pectine acétyl estérase

Pds : plasmodesmes

PE : pectine estérase

PG: polygalacturonase

PGA: acide polygalacturonique

PM : poids moléculaire

PME: pectin méthylestérase

PPU: pore plasmodesmata unit

PRP: proline-rich protein

PTGS : post-transcriptional gene silencing

RG II: rhamnogalacturonane II

RG I: rhamnogalacturonane I

RPRP: repetitive proline-rich protein (= PRP)

RT : room temperature

Sa: *Sinapis alba*

SAM: shoot apical meristem

SCM: single-chain mechanism

SDS: sodium dodécyl sulphate

SEL : seuil limite d'exclusion

Susy: sucrose synthase

TMV: tobacco mosaic virus

Tp: tampon

V : végétatif

XG : xyloglucane

---

XGA : xylogalacturonane

ZC : zone centrale

ZM: zone méristématique

ZM<sub>sl</sub> : zone méristématique au sens large (ZP, ZC, L1+L2, L3+M)

ZNM: zone non méristématique

ZP : zone périphérique



# Introduction & Objectifs du travail



Le site essentiel des processus de morphogenèse de la partie aérienne des plantes est le méristème apical de tige (SAM : shoot apical meristem) (Steeve & Sussex, 1989 ; Lyndon, 1998). Au cours de la vie d'une plante, le SAM passe tout d'abord par une phase végétative durant laquelle il édifie plusieurs feuilles et les segments de tige correspondants. A un moment donné, qui, selon les espèces, dépend des conditions climatiques ou de facteurs endogènes, le SAM cesse son activité végétative et démarre son activité reproductrice, l'amenant à produire des fleurs.

Chez les plantes photopériodiques, cette étape est provoquée par une modification de la longueur des jours. Le système expérimental choisi, le SAM de *Sinapis alba* L. induit à fleurir par un unique jour long (JL), présente de nombreux avantages. Sa transition florale est courte et se produit en parfait synchronisme chez tous les individus d'une population (Bernier, 1989).

De plus, de nombreux événements physiologiques, cellulaires et moléculaires de la transition florale ont déjà été décrits chez cette espèce et constituent de précieux repères spatiaux et temporels (Bernier, 1988 ; Jacquemard *et al.*, 1998 ; Bonhomme *et al.*, 2000 ; *etc.*). Les caractéristiques de ce matériel végétal seront présentées plus en détail dans la troisième partie du « Relevé de la littérature ».

Le méristème n'étant pas sensible à la lumière, ce sont les feuilles adultes qui perçoivent le changement de photopériode. Elles élaborent ensuite un ensemble de signaux, regroupés sous le terme de « stimulus floral », et transitant vers l'apex. Cependant, les divers composants connus de ce stimulus, ensemble ou pris séparément, sont incapables de provoquer toutes les modifications observées dans le méristème au cours de la transition florale (Bernier *et al.*, 1981 a et b, 1993).

D'autres candidats possibles pour des signaux de morphogenèse sont les oligosaccharides. Ces fragments de polysaccharides, provenant des parois de plantes ou de champignons, sont capables de contrôler des fonctions vitales chez les plantes telles que la croissance, le développement, la reproduction et la défense contre les maladies (Albersheim & Darvill,

1985). Les expériences de Tran Thanh Van *et al.* (1985), Eberhard *et al.* (1989), et Marfà *et al.* (1991) ont montré que des fragments pectiques d'érable étaient capables d'induire la formation de fleurs sur des explants de tabac. Ces fragments ont été identifiés comme étant des oligogalacturonides, provenant de la dégradation d'un type particulier de pectines, les homogalacturonanes.

---



---

**Figure 1** : *Sinapis alba* – La moutarde blanche.



---

Le groupe de Milyaeva (Milyaeva & Nikiforova, 1996 ; Komarova, 1998 ; Nikiforova *et al.*, 1999 ; Milyaeva & Nikiforova, 1995) a apporté les premières indications quant à l'implication de fragments pectiques dans le contrôle de la mise à fleurs *in vivo*. Ces auteurs ont notamment montré que l'application d'acide octagalacturonique ou d'enzymes pectolytiques sur le bourgeon apical de deux plantes photopériodiques, *Rudbeckia bicolor* (plante en rosette, de JL) et *Perilla nankinensis* (plante de JC), induisait la formation d'une tige florale chez la première, et de boutons floraux chez la seconde, en conditions photopériodiques défavorables.

D'autre part, la morphogenèse des structures d'un organisme pluricellulaire requiert la coordination spatiale et temporelle d'une multitude d'activités. Cette coordination très précise exige des moyens de communication performants à tous les niveaux d'organisation, depuis le niveau organismique jusqu'au niveau intracellulaire. L'importance des communications spécifiques au sein du méristème lors de la transition florale a été mise en évidence par un grand nombre de travaux.

Ainsi, certains gènes s'expriment dans des territoires différents du SAM mais interagissent étroitement en se régulant l'un l'autre de façon non autonome sur le plan cellulaire (Bradley *et al.*, 1996). Des signaux dépendants de ces gènes doivent donc être transmis de cellule à cellule dans le SAM, probablement *via* les plasmodesmes. La synchronisation des cellules du SAM dans leur cycle de division, observée au cours de la transition florale chez plusieurs espèces (Bernier *et al.*, 1967 ; Jacquard & Mikshe, 1971 ; Ormrod & Bernier, 1990), implique probablement aussi un échange de signaux spécifiques entre les territoires cellulaires concernés.

D'importantes modifications des communications symplasmiques (*via* les plasmodesmes) sont observées dans le SAM de *Sinapis* lors de la transition florale : la fréquence des plasmodesmes augmente très fortement dans l'ensemble du SAM et ces derniers sont d'origine secondaire, leur formation nécessite donc l'implication d'enzymes pectolytiques (Ormenese, 2001 – thèse de doctorat – Ulg ; Ormenese *et*

*al.*, 2000). Malgré cette augmentation uniforme de la fréquence des plasmodesmes, le SAM est loin de constituer un unique champ symplasmique. Des expériences de microinjection d'une sonde fluorescente imperméable aux membranes dans une cellule du méristème et le suivi de la propagation de cette sonde au travers des plasmodesmes ont de plus démontré que le champ symplasmique superficiel et central des SAM végétatifs change de forme et de taille lors de la transition florale (Ormenese *et al.*, 2002).

---

Ce remaniement des échanges entre les cellules du méristème ne peut évidemment se faire sans une modification plus ou moins profonde au niveau des parois.

---

Enfin, le développement de puissantes sondes immunologiques a permis de montrer l'importance des variations de composition des polysaccharides de la paroi au cours de phénomènes de développement très divers (Willats *et al.*, 1999a ; Willats *et al.*, 2000). La pectine, et plus particulièrement les homogalacturonanes, ont fait l'objet de nombreux travaux. Ceux-ci sont détaillés dans la 1<sup>ère</sup> partie du « Relevé de la littérature ». En raison notamment de leur implication dans l'adhésion cellulaire (McDougall *et al.*, 1996 ; Willats *et al.*, 2001a), essentielle pour les processus de morphogenèse (Iwai *et al.*, 2001), mais également dans le contrôle de la porosité pariétale et donc des communications apoplastiques (Baron-Epel *et al.*, 1988 ; Carpita & Gibeaut, 1993), on peut s'attendre à ce que les pectines du SAM de *Sinapis* subissent d'importantes modifications quantitatives et qualitatives au cours du passage de l'état végétatif à l'état floral.

---

Pourtant, aucune étude n'existe sur cette question et c'est dans le but de combler cette lacune que nous avons entrepris le présent travail, unissant la longue expérience acquise par le laboratoire de Physiologie Végétale de l'Université de Liège sur la transition florale de *Sinapis alba* et celle de l'Unité de Recherches en Biologie cellulaire Végétale de l'Université de Namur sur les pectines et la paroi cellulaire.

---

- 
- Notre analyse immunocytochimique des pectines de SAM de *Sinapis* végétatifs et induits utilise l'anticorps 2F4, reconnaissant les homogalacturonanes acides, sous leur conformation en « boîte à œufs » induite par le calcium (Liners *et al.*, 1989).
    - La nature et la localisation des pectines dans le SAM de plantes végétatives n'ayant encore fait l'objet d'aucune étude, la première partie de nos résultats est consacrée à cette question.
    - La seconde partie aborde les modifications quantitatives et qualitatives des pectines, observées dans l'ensemble du SAM au cours de la transition florale.

Ces deux premières parties sont chacune constituées d'un article en voie de publication.
    - La troisième partie du volet consacré à l'étude de la pectine dans le SAM de *Sinapis* vise à identifier les zones du méristème apical concernées par ces modifications des pectines au cours de la transition florale.
  - Un second volet est consacré à la production d'un polysérum dirigé contre une zone conservée d'une enzyme pectolytique impliquée dans le remaniement des homogalacturonanes, la pectine méthylestérase, en vue de l'étude de cette enzyme au niveau traductionnel dans le SAM de plantes végétatives et induites à fleurir.

Le rôle et les caractéristiques de cette enzyme pariétale majeure sont présentés en détails dans la seconde partie du « Relevé de la littérature ».



Relevé  
de la  
littérature



# Les pectines et la paroi cellulaire végétale

---

La paroi végétale est une structure polysaccharidique et protéique entourant et séparant les cellules, et servant de soutien à la plante. Elle protège contre les pathogènes, la déshydratation et d'autres assauts de l'environnement. Elle permet l'adaptation aux stress osmotiques, le stockage de polysaccharides, d'ions métalliques et d'autres matériaux. Bien qu'elle ait une composition radicalement différente de la matrice extracellulaire des métazoaires, il semble qu'elle joue des rôles semblables. Ainsi, toutes deux permettent les communications intercellulaires et avec l'environnement extérieur qui sont absolument nécessaires à un organisme pluricellulaire. Le fait que des structures si différentes servent des buts similaires est une indication de l'importance de la **communication cellulaire** pour le développement d'un organisme multicellulaire, et fait de cette communication un réel principe de développement (Meyerowitz, 1999).

En raison de sa position et de ses propriétés physiques, la matrice extracellulaire des cellules végétales est potentiellement capable d'influencer presque tous les aspects de la fonction cellulaire, et nombreux sont ceux qui proposent pour cette paroi un rôle dans le développement des cellules et les réactions face au monde extérieur. Les parois cellulaires contiennent des marqueurs de surface qui déterminent la voie de développement à suivre et ainsi la localisation de la cellule dans la plante (Berger *et al.*, 1994 ; Scheres, 2001). En interagissant avec des protéines membranaires, elles maintiennent la continuité entre la membrane plasmique et le cytosquelette, et permettent d'informer le cytoplasme sur l'état de la paroi (Kohorn, 2000 ; Cosgrove, 2001). Leur implication est également évidente dans le stockage et la libération de molécules-signal, ou encore le contrôle des échanges intercellulaires, notamment *via* les plasmodesmes (Carpita & Gibeau, 1993 ; Cosgrove, 1999). Elles permettent en outre le contrôle spatial et temporel de la croissance des cellules, déterminant clé de la morphogenèse des plantes

(Cosgrove, 2000a). La figure 2 présente un résumé des divers rôles de la paroi cellulaire avec, en encadrés, un détail des quatre fonctions nous intéressant plus particulièrement.

Bien que le mode de fonctionnement de la paroi dans le contrôle de ces événements reste mal connu, de récents progrès ont été faits dans la compréhension des molécules impliquées et dans la façon dont elles interagissent entre elles et avec la cellule.

**Figure 2 :** résumé des divers rôles de la paroi cellulaire et des pectines. →

*Cadre vert : libération de molécules à rôle de signal (Ridley et al., 2001). OGA : oligogalacturonides.*

*Cadre rose : contrôle du devenir et de la différenciation cellulaire (Berger et al., 1994; Scheres, 2001) – deux mécanismes différents, l'un dépendant de la position des cellules (contrôlé par l'environnement spatial ainsi que par des facteurs physiologiques et génétiques), l'autre dépendant de la lignée cellulaire.*

*Cadre bleu : contrôle de l'hydratation, la porosité des parois et les échanges intercellulaires.*

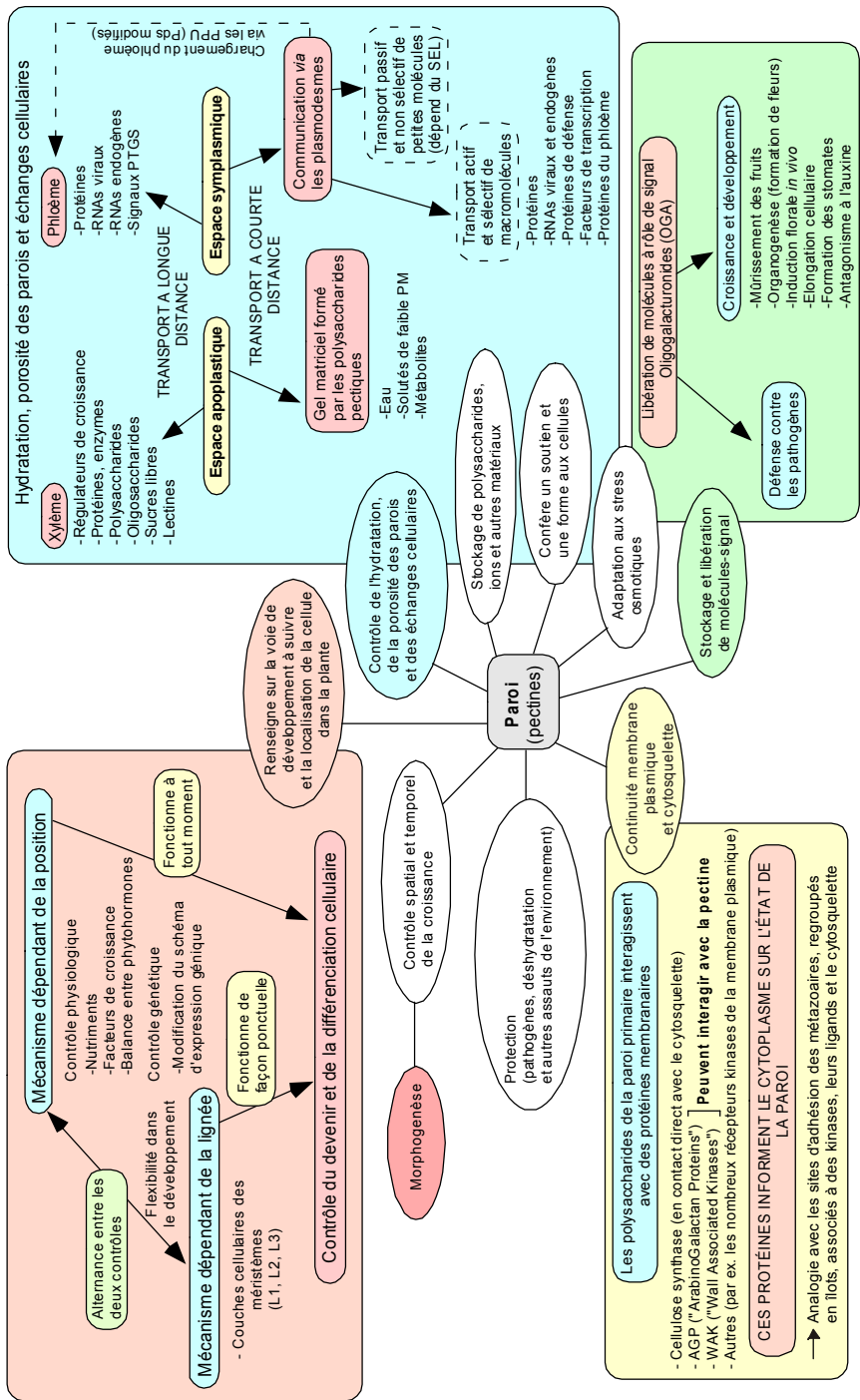
*A gauche : la configuration du réseau pectique matriciel crée des pores au sein de la paroi : espace apoplastique (Carpita et al., 1979 ; Baron-Epel et al., 1988), permettant le transport de composés à courte distance, mais également à longue distance car les vaisseaux xylémiens peuvent être considérés comme un espace apoplastique à l'intérieur de la plante. Transport à longue distance de diverses substances (Satoh et al., 1992 ; Masuda et al., 1999 ; Iwai et al., 2003) fournissant une connexion fonctionnelle entre la racine et les autres organes.*

*A droite : en mettant en connexion les cytoplasmes de cellules voisines, les plasmodesmes (Pds) créent ce que l'on appelle le symplasma, et assurent la communication de toutes les cellules d'un organisme entre elles (Haywood et al., 2002). Cet espace symplasmique permet le transport de composés à courte distance via les Pds, mais également à longue distance via les PPU (Pores Plasmodesmata Units : Pds modifiés permettant le chargement du phloème). SEL : Seuil limite d'exclusion, PM : poids moléculaire, PTGS : Post-Transcriptional Gene Silencing.*

*Cadre jaune : les mécanismes par lesquels la cellule perçoit et répond aux changements des propriétés pariétales ne sont pas compris (Ridley et al., 2001), mais quelques données suggèrent que les polysaccharides de la paroi primaire interagissent (directement ou indirectement) avec des protéines membranaires, permettant d'informer le cytoplasme sur l'état de la paroi (Kohorn, 2000 ; Cosgrove, 2001).*

*Avec chacune de ces fonctions de la paroi, la boucle est bouclée entre paroi cellulaire et contrôle du développement à l'échelle de la plante entière.*





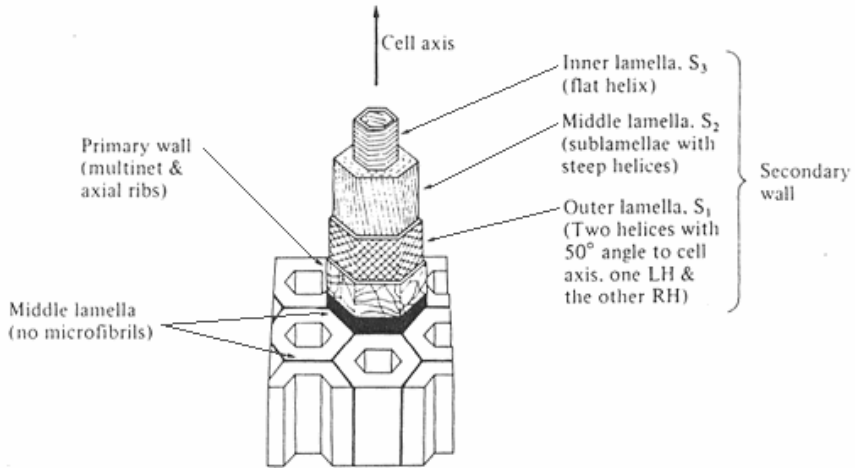
La paroi primaire entourant toutes les cellules végétales est un composé fibreux dans lequel les microfibrilles de cellulose sont reliées les unes aux autres par des glycanes. Le réseau de cellulose et de glycanes est englobé dans une matrice plus soluble de polysaccharides, de glycoprotéines, de protéoglycanes, de composés de plus faible poids moléculaire et d'ions. La pectine est un composant majeur de la matrice pariétale de toutes les plantes terrestres et est constituée par toute une gamme de polysaccharides riches en acides galacturoniques. Elle est principalement associée à la paroi primaire et est aussi abondante au niveau de la lamelle mitoyenne entre les parois primaires. La matrice pectique fournit un environnement pour le dépôt, le glissement et l'extension du réseau de cellulose et de glycanes, est impliquée dans le contrôle de la porosité pariétale et joue un rôle majeur d'adhésif entre les cellules.

Ce chapitre, après un rappel de la structure de cette paroi, tentera de mettre en évidence les rôles complexes qu'elle joue, structuraux, fonctionnels, développementaux et autres, au sein de l'organisme pluricellulaire qu'est la plante. Nous mettrons principalement l'accent, à tous les niveaux, sur le rôle des pectines et des acides polygalacturoniques, concernés par notre travail.

## ■ Structure de la paroi des dicotylédones

La première couche pariétale formée par une cellule végétale est la **lamelle mitoyenne**, dérivée de la plaque cellulaire déposée lors de la mitose. Très mince (moins de 30 nm), elle est localisée au centre de la paroi double formée par deux cellules adjacentes et assure le maintien de l'adhésion intercellulaire (figure 3). Elle est constituée en grande partie de polysaccharides pectiques.

La **paroi primaire**, fine (0,1 à 0,2  $\mu\text{m}$ ) et souple, est déposée lors de la croissance cellulaire. Elle est formée d'un réseau lâche de microfibrilles de cellulose noyé dans une matrice très hydratée, composée essentiellement d'hémicelluloses, de pectines et d'un peu de protéines.



**Figure 3:** Organisation générale de la paroi d'une cellule végétale.

La **paroi secondaire**, nettement plus rigide et plus épaisse que la paroi primaire, est formée par certains types cellulaires au cours de l'étape de différenciation qui suit l'arrêt de la croissance. Elle est composée d'un réseau dense et ordonné de microfibrilles de cellulose, entouré d'une phase matricielle réduite et peu hydratée comportant surtout des hémicelluloses. Elle peut être imprégnée de lignine, le processus de lignification débutant au niveau de la lamelle mitoyenne et s'étendant progressivement à la paroi primaire et à la paroi secondaire.

Les cellules méristématiques ainsi que les cellules de type parenchymateux constituant le bourgeon apical chez *Sinapis* sont entourées uniquement de parois primaires riches en pectines. Le point suivant est donc consacré à un bref rappel de la structure de ces parois primaires. Nous nous limitons ici à la description du modèle de paroi de type I (Carpita & Gibeaut, 1993) – représentatif de toutes les dicotylédones et de certaines monocotylédones.

## Structure de la paroi primaire - modèle de type I

---

Le modèle proposé par Carpita & Gibeaut (1993) attribue la cohésion structurale de la plupart des plantes à fleurs à des associations non covalentes entre leurs principaux composants, organisés en trois réseaux entremêlés (figure 4) :

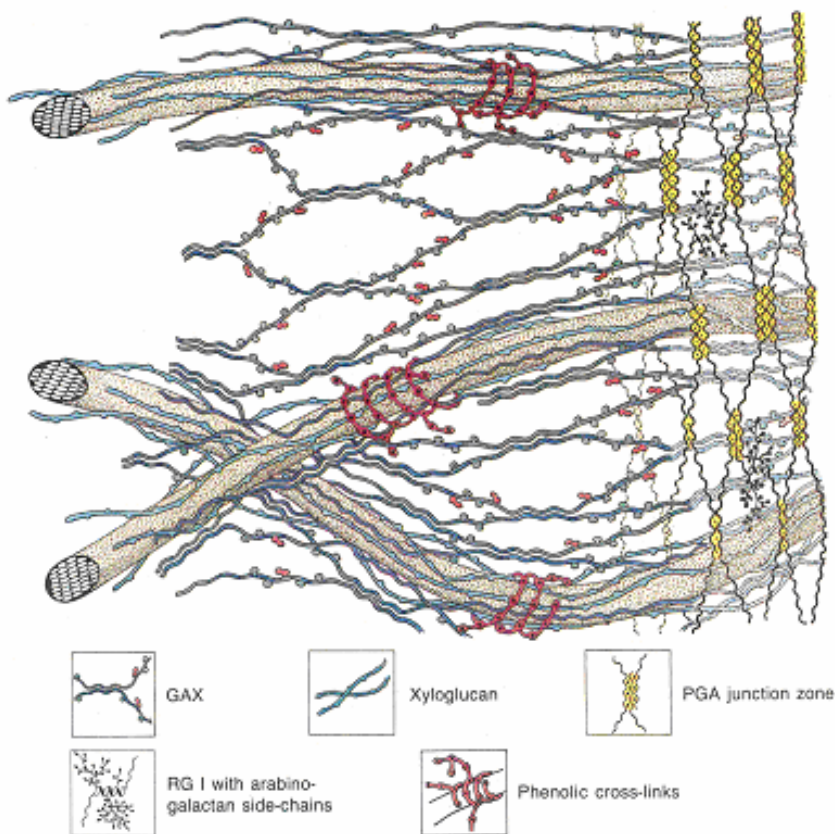
- un **réseau cellulose – xyloglucane** : interconnexions *via* des ponts hydrogènes
- un **réseau pectique** : liaisons intermoléculaires, par des ponts calciques notamment
- un **réseau protéique** : molécules reliées entre elles de manière covalente

Ces différents réseaux sont structurellement indépendants mais pourraient toutefois interagir entre eux.

### ● Réseau de cellulose-xyloglucane

Le réseau fondamental, cristallin, est formé de plusieurs douzaines de microfibrilles de **cellulose** : chaînes linéaires de D-glucose liés en  $\beta$ -(1→4).

Les principaux polysaccharides interagissant avec la cellulose sont des xyloglucanes (XG) : chaînes linéaires de (1→4)- $\beta$ -D-glucanes différant de la cellulose par la présence de nombreux résidus xylose, et par d'autres types de substitutions incluant des unités galactose, fucose et arabinose. D'autres polysaccharides non cellulosiques peuvent se lier aux microfibrilles dans certains types de parois primaires, mais ils s'accumulent préférentiellement dans les tissus différenciés. Ces polysaccharides amorphes (XG ou autres) sont appelés hémicelluloses et forment, avec les pectines, ce que l'on appelle la **matrice** de la paroi.



**Figure 4 :** modèle de l'organisation de la paroi primaire de la plupart des plantes à fleurs (Carpita & Gibeaut, 1993). Coexistence de trois réseaux entrelacés, formés par les microfibrilles de cellulose, les xyloglucanes et les pectines.

Il existe plusieurs modèles décrivant le mode d'interaction des fibrilles de cellulose et de XG. Selon Carpita & Gibeaut (1993), une des surfaces du squelette des XG se fixe fortement aux microfibrilles de cellulose, formant probablement une monocouche à leur surface. Les autres chaînes s'entrelacent et établissent des ponts entre les différentes microfibrilles de cellulose (figure 4). C'est donc au niveau des XG que se fait la régulation de l'extension pariétale. Toutefois, Cosgrove (2000a) présente trois modèles alternatifs (voir annexe 1) et selon les plus récents (Talbot & Ray, 1992 ; Ha *et al.*, 1997), les XG ne constituent pas nécessairement la clé de l'expansion pariétale. Les pectines et les hémicelluloses intermédiaires sont aussi candidats : ces

polymères présentent une plus grande mobilité et sont ainsi des déterminants possibles de l'expansion de la paroi ou pourraient contrôler l'espacement et les interactions entre les couches de microfibrilles de cellulose, ainsi que l'épaisseur totale de la paroi.

## ● Réseau pectique

### □ Structure primaire des polymères pectiques

La pectine, constituant important de la paroi cellulaire des dicotylédones, est une famille de polysaccharides complexes contenant des résidus d'acide  $\alpha$ -D-galacturonique liés en (1→4) et pas moins de 16 autres monosaccharides différents. On distingue plusieurs polysaccharides pectiques : les homogalacturonanes, les rhamnogalacturonanes I et les galacturonanes substitués (xylogalacturonanes et rhamnogalacturonanes II). Ces polymères constituent chacun un domaine du réseau pectique (Vincken *et al.*, 2003 ; Ridley *et al.*, 2001).

#### - Homogalacturonanes

Les **homogalacturonanes**<sup>1</sup> (**HG**) sont composés d'une chaîne linéaire d'acides  $\alpha$ -D-galacturoniques liés en (1→4) et pouvant comporter jusqu'à 200 monomères (Jarvis, 1984 ; Ridley *et al.*, 2001). Ils possèdent des fonctions acides carboxyliques qui peuvent être partiellement méthylestérifiées (figure 5).

Le **degré de méthyl-estérification (DM)**<sup>2</sup> est généralement élevé dans les pectines natives des plantes supérieures (> 70, 80 %). Ce DM varie d'un type cellulaire à l'autre et diminue au cours de la croissance pariétale. Les polymères pectiques, synthétisés et sécrétés sous forme hautement méthylestérifiée (Jarvis, 1984) sont désestérifiés au cours de la croissance. Ainsi les pectines des cellules matures sont très acides, alors que

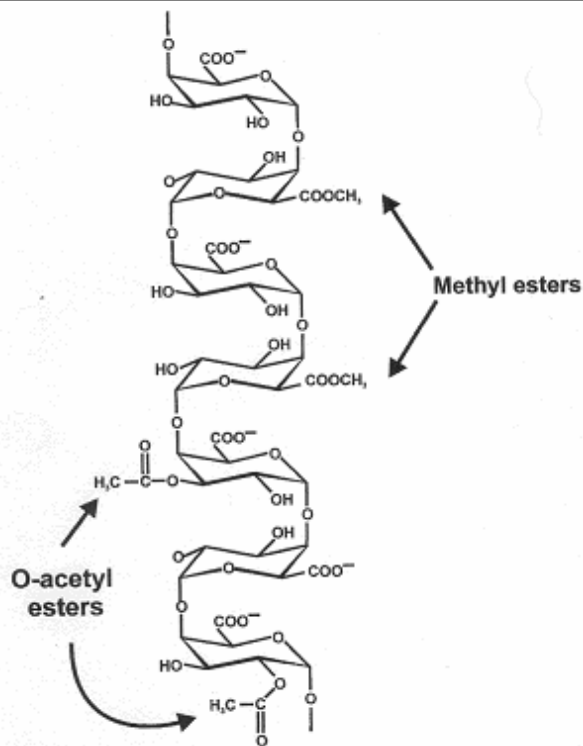
---

<sup>1</sup> Homogalacturonanes – aussi appelés acides polygalacturoniques (**PGA**).

<sup>2</sup> Degré de méthylestérification (DM) : proportion d'acides galacturoniques méthyl-estérifiés pour 100 acides galacturoniques totaux.

celles des cellules jeunes sont hautement méthylestérifiées. Les groupements méthyl-esters semblent être distribués au hasard le long de la chaîne homogalacturonique. Les fonctions COOH non estérifiées peuvent être neutralisées par des cations sodium, potassium, calcium et magnésium.

Enfin, les fonctions alcool secondaire (en C-2 et C-3) des acides galacturoniques peuvent être estérifiées par des groupements acétyles (**degré d'acétylestérification - DA <10 %**).



**Figure 5 :** structure primaire des homogalacturonanes (HG) - polymères linéaires d'acides α-D-galacturoniques liés en (1→4). Certains des résidus d'acide galacturonique sont estérifiés par du méthanol. Ils peuvent également être estérifiés par de l'acide acétique en C2 et C3. Au moins trois enzymes sont nécessaires à la synthèse des HG (galacturonosyl transférase, homogalacturonane méthyltransférase et homogalacturonane acétyltransférase). Repris de Ridley et al., 2001.

## - **Xylogalacturonanes**

Il existe en outre des **xylogalacturonanes (XGA)**, galacturonanes substitués par des résidus de (1→3)-β-D-xylose. Les résidus acides galacturoniques des XGA peuvent être méthylestérifiés, comme le sont ceux des HG (Vincken *et al.*, 2003). Les XGA ne semblent pas très répandus parmi les autres domaines pectiques (McCartney *et al.*, 2000).

## - **Rhamnogalacturonanes I**

Les **rhamnogalacturonanes I (RG I)**, de poids moléculaire élevé, ont un squelette de base formé de l'alternance de monomères d'acide α-D-galacturonique et de α-L-rhamnose<sup>3</sup>. Les résidus acides galacturoniques peuvent porter des groupements acétyles, et 20 à 80 % des résidus rhamnose peuvent être substitués par des sucres neutres (Vincken *et al.*, 2003).

Les chaînes latérales prédominantes peuvent être de simples unités d'acides β-D-galacturoniques liés en (1→4), mais aussi des polymères comme les arabinogalactanes I (AG I) ou les arabinanes. Les complexes formés par les RG I, AG I et arabinanes sont souvent dénommés « régions hérissées », dans lesquelles les AG I et arabinanes représentent les « poils ». L'abondance des régions hérissées et la quantité et la nature de ces poils peuvent différer considérablement d'une espèce à une autre (Vincken *et al.*, 2003).

Notons également ici la présence de chaînes d'arabinogalactanes II. Ces polysaccharides sont principalement associés à des protéines (protéoglycanes complexes connus sous le nom d'arabinogalactan-proteins - AGP), et leur appartenance au réseau pectique n'est pas encore très claire. Toutefois, les pectines et les AG II semblent être extraits simultanément et il

---

<sup>3</sup> Répétition du disaccharide  $[\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rha-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GalA-(1}\rightarrow ]_n$ , où n peut être plus grand que 100 (Vincken *et al.*, 2003).



est ensuite difficile de les séparer, ce qui suggère qu'ils peuvent être liés de façon covalente (Vincken *et al.*, 2003).

## - **Rhamnogalacturonanes II**

Les HG peuvent contenir des régions possédant quatre chaînes latérales différentes avec des sucres très particuliers. Ces chaînes latérales, ainsi que les neuf résidus acides galacturoniques (approximativement) auxquels elles sont connectées sont nommées **rhamnogalacturonanes II (RG II)**.

Le nom, rhamnogalacturonane II, est peu approprié car il suggère que sa structure contient un squelette rhamnogalacturonique comme celui du RG I, alors que le squelette est le même que celui des HG. Les résidus rhamnose sont présents dans les chaînes latérales du RG II plutôt que dans le squelette. La structure de ce polymère est fortement conservée chez les plantes, mais il reste des inconnues : la distribution des quatre chaînes latérales du RG II, ainsi que celle du RG II dans les HG, reste notamment à établir (Vincken *et al.*, 2003). Il semble que la molécule adopte une conformation tridimensionnelle globulaire pouvant jouer un rôle structural important (Bouton *et al.*, 2002).

## □ **Modèles de la structure macromoléculaire de la pectine**

Les modèles actuels mettent en avant la prédominance de liaisons non covalentes entre les polymères pariétaux (Carpita & Gibeaut, 1993). Toutefois, il existe des données substantielles montrant que les molécules de RG II sont liées de façon covalente par des esters de bore (Ridley *et al.*, 2001).

## **Liaisons entre les macromolécules pectiques et formation de réseaux**

Il existe trois types de liaisons principales permettant l'interconnexion des molécules pectiques : la formation de gels

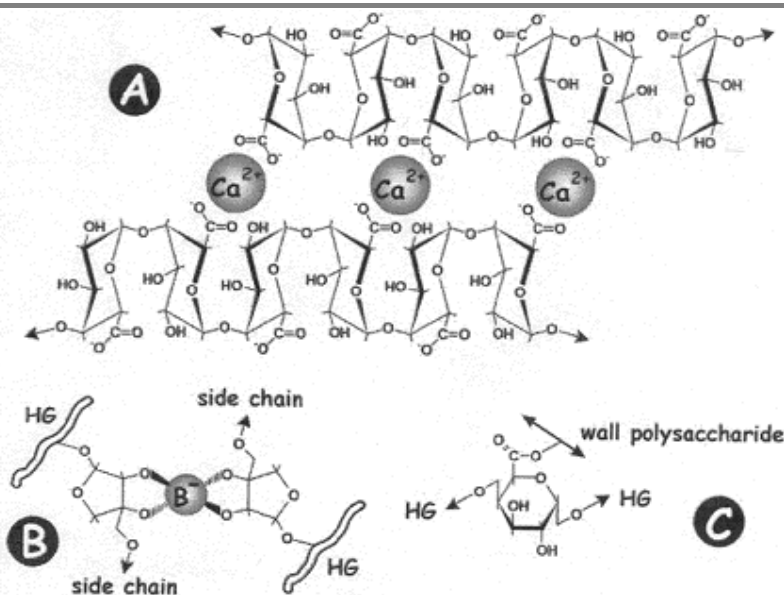
calciques entre chaînes d'homogalacturonanes, la dimérisation du RG II par l'intermédiaire d'esters de bore et enfin les uronyl esters (figure6).

### ○ Gels calciques – liaisons anioniques

Les acides polygalacturoniques (PGA) se comportent dans les parois comme des échangeurs d'ions très sélectifs, s'associant préférentiellement aux cations de valence élevée. La liaison de cations peut influencer l'état conformationnel de la pectine et donc les propriétés du réseau pectique (Gillet *et al.*, 1998).

Selon le **modèle en « boîte à œufs »** (Grant *et al.*, 1973) (voir figure 6 A) - modèle décrivant la liaison intermoléculaire de chaînes d'HG par l'intermédiaire du  $\text{Ca}^{2+}$  le plus largement cité dans la littérature - deux chaînes d'acides uroniques anti-parallèles mises en vis-à-vis délimitent des cavités dans lesquelles des cations divalents peuvent venir se loger et interagir de manière électrostatique avec les fonctions  $\text{COOH}$  situées sur la face interne des chaînes impliquées, mais aussi avec un certain nombre d'autres atomes d'oxygène qui participeraient au processus de liaison par l'intermédiaire de leurs paires électroniques libres. Cette association nécessite un pH proche de la neutralité et, d'après le modèle de paroi de type I, un certain nombre d'oligogalacturonides s'agencent de cette façon *in vivo*.

Cette fixation est coopérative : la liaison du premier cation entre une paire de molécules provoque leur alignement, facilitant la liaison de l'ion suivant, et ainsi de suite. Suivant la concentration en calcium, ces dimères pourraient s'agencer en tétramères puis en multimères. On ne connaît pas le nombre maximal de chaînes pouvant s'agencer de cette façon. Cependant, l'association multimérique semble thermodynamiquement moins favorable. La stabilité des dimères en « boîte à œufs » est fonction de la longueur des chaînes participant à leur formation : une longueur d'environ 14 acides galacturoniques semble nécessaire pour obtenir des dimères stables (Jarvis, 1984 ; Liners, 1994).



**Figure 6** : les molécules pectiques peuvent être interconnectées de différentes façons. A : interactions par l'insertion d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  entre les groupements carboxyliques des résidus d'acides galacturoniques de deux chaînes d'homogalacturonanes (modèle en « boîtes à œufs »). B : les chaînes d'HG peuvent aussi être connectées par l'intermédiaire de borate-diols, formés entre les résidus apiose présents dans les chaînes latérales du RG II comportant du 2-O-méthyl-xylose. C : des uronyl esters peuvent être formés par une réaction de trans-estérification, dans laquelle un acide galacturonique méthylestérifié est le substrat donneur. En principe, n'importe quel type de polysaccharide peut jouer le rôle d'accepteur. Repris de Vincken et al., 2003.

L'association intermoléculaire de séquences de PGA médiée par les ions  $\text{Ca}^{2+}$  est à la base d'une propriété très importante des pectines : la **gélification**. Le nom pectine vient en effet du grec *πλκτος* (coagulé, figé). Un gel est un système où des molécules d'eau ou d'autre solvant sont retenues par une substance donnée organisée en un réseau tridimensionnel. Les associations entre les domaines structuraux réguliers de deux ou plusieurs chaînes forment des zones de jonction (dans lesquelles les chaînes de PGA adoptent une conformation hélicoïdale), qui sont séparées par des zones non associées. Les chaînes latérales et les groupements méthyl- et acétylesters limitent les associations inter- chaînes et contribuent ainsi à la solubilisation et à l'hydratation du réseau (Jarvis, 1984).

Notons également que, *in vitro*, les pectines largement méthylestérifiées forment des **gels acides** souples sans intervention de cations bivalents. Les zones de jonction de ces gels résultent des associations intermoléculaires réalisées entre deux segments de deux chaînes estérifiées parallèles, par l'intermédiaire de ponts hydrogènes et de liaisons hydrophobes entre groupements méthylesters (sous des conditions de pH et d'activité de l'eau faibles – adjonction de sucre) (Jarvis, 1984).

Bien que les conditions dans la matrice pariétale ne sont pas appropriées pour la formation de tels gels, des gels de type intermédiaire ont été proposés (Jarvis, 1984) et il est possible que l'association de chaînes d'HG fortement méthylestérifiées puisse contribuer à la structure des gels pectiques *in planta* (Willats *et al.*, 2001a) et au maintien de l'adhésion cellulaire (McDougall *et al.*, 1996).

#### ○ Dimérisation du RG II - Borate-diol esters

Deux molécules de RG II peuvent se complexer par l'intermédiaire du bore, formant un borate-diol ester (Reid, 2000 ; Ishii *et al.*, 1999) (figure 6 B). En raison du fait que le RG II fait partie intégrante des HG, les esters de bore peuvent provoquer l'interconnexion de deux chaînes d'HG (Vincken *et al.*, 2003).

Certains cations dont le  $\text{Ca}^{2+}$  stimulent la formation du dimère *in vitro*. De plus, le  $\text{Ca}^{2+}$  stabilise les complexes de bore dans la pointe racinaire. Le calcium *in muro* semble donc avoir un rôle, encore non identifié, en un site spécifique proche du lien établi par l'ester de bore (Ridley *et al.*, 2001).

La large présence du RG II dans le règne végétal et la conservation de sa structure indiquent un rôle distinct pour ce constituant pectique au niveau de l'intégrité pariétale. Ainsi, la formation des dimères RG II-bore détermine l'épaisseur de la paroi dans les tissus du potiron (Ishii *et al.*, 2001) et cette

dimérisation est nécessaire à la croissance d'*Arabidopsis* (O'Neill *et al.*, 2001).

De plus, Iwai *et al.* (2002) ont montré – par l'analyse du mutant de tabac, *nolac-H18* (pour *non organogenic callus with loosely attached cells*) - que la dimérisation du RG II est essentielle à la cohésion intercellulaire dans le méristème<sup>4</sup>. Le gène muté est NpGUT 1 et code pour une glucuronyltransférase. Chez ce mutant, le RG II ne possède pas de  $\beta$ -acide glucuronique ni de  $\alpha$ -L-galactose dans la chaîne latérale permettant la dimérisation par le bore, ce qui inhibe fortement cette dimérisation et par conséquent, l'adhésion intercellulaire.

#### ○ Uronyl esters et autres liens

Les HG peuvent se lier à d'autres composants par des **uronyl esters** (Brown & Fry, 1993 – repris de Vincken *et al.*, 2003) (figure 6 C). Certaines PME<sup>5</sup> particulières peuvent catalyser une réaction de transestérification, utilisant un HG méthylestérifié comme substrat donneur et d'autres molécules d'HG comme accepteurs. L'énergie du lien ester est ainsi utilisée pour la gélification de la matrice pectique (Ridley *et al.*, 2001 ; Vincken *et al.*, 2003). Ce lien ester peut être établi entre le groupement carboxylique d'un acide galacturonique et le groupement hydroxyle d'un autre résidu glycosidique, ce qui indique que la liaison est possible avec n'importe quel autre polysaccharide pariétal. En raison du fait que les HG sont déposés dans la paroi sous forme méthylestérifiée, il est évident que ces molécules détiennent un énorme potentiel pour l'interconnexion des polymères pariétaux (Ridley *et al.*, 2001; Vincken *et al.*, 2003).

<sup>4</sup> Les méristèmes étant particulièrement pauvres en  $\text{Ca}^{2+}$  par rapport à d'autres parties de la plante, et riches en pectines estérifiées, la formation de gels calciques y est compromise (Carpita & Gibeaut, 1993).

<sup>5</sup> Les PME sont des enzymes pectolytiques capables d'enlever les groupements méthylesters des HG.

La présence d'acides galacturoniques estérifiés par d'**autres esters** que des méthylesters a été démontrée dans les parois de cellules de maïs, de tabac, d'épinards et de carottes, bien qu'aucun fragment d'HG contenant des esters inhabituels n'a jamais été isolé et caractérisé (Ridley *et al.*, 2001). Dans les parois de l'épinard et de la betterave, certains résidus arabinose et galactose sont estérifiés par des acides hydroxycinnamiques tels que les acides féruliques et coumariques. Ces résidus phénoliques sont des sites potentiels d'interconnexion par couplage oxydatif. Ce qui permettrait la liaison aux autres pectines ou aux polysaccharides non cellulosiques (Carpita & Gibeau, 1993 ; Ridley *et al.*, 2001). Toutefois, l'existence *in muro* de liaison intermoléculaire des pectines par des dihydroferuloylesters n'a pas été démontrée.

La présence de **complexes pectine-hémicellulose**, pouvant être formés par l'intermédiaire de matériel phénolique non identifié a pourtant été rapportée, notamment chez le chou-fleur (Femenia *et al.*, 1999). On pense qu'une portion des pectines et des xyloglucanes est liée de façon covalente, par les chaînes arabinanes et galactanes du RG I (Thompson & Fry, 2000 – repris de Willats *et al.*, 2001a).

Il existe également des preuves indiquant une **liaison avec la cellulose** par l'intermédiaire des galactanes du RG I (Foster *et al.*, 1996 – repris de Willats *et al.*, 2001a). En plus des nombreuses études ayant rapporté la liaison entre les pectines et les hémicellulose, il existe des données indiquant la **liaison des pectines et des glycoprotéines pariétales**, mais des preuves décisives concernant l'interconnexion de ces différents composés sont manquantes (Ridley *et al.*, 2001). Une interaction pectine-protéine fonctionnant durant l'adhésion du tube pollinique dans le style du lys a récemment été décrite (Mollet *et al.*, 2000).

### **Vers un nouveau modèle de pectine dans la paroi...**

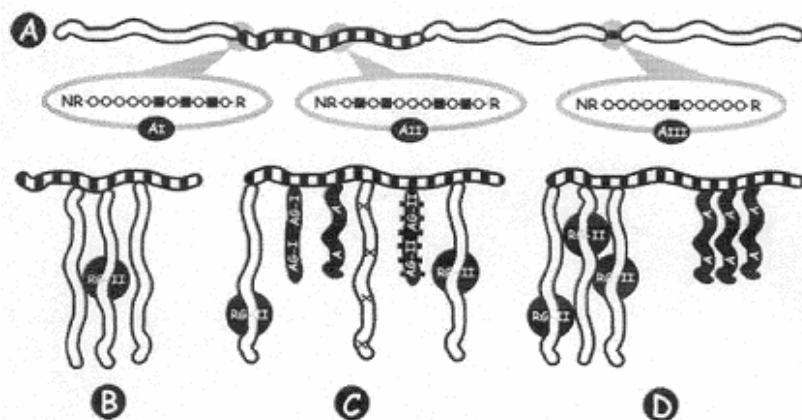
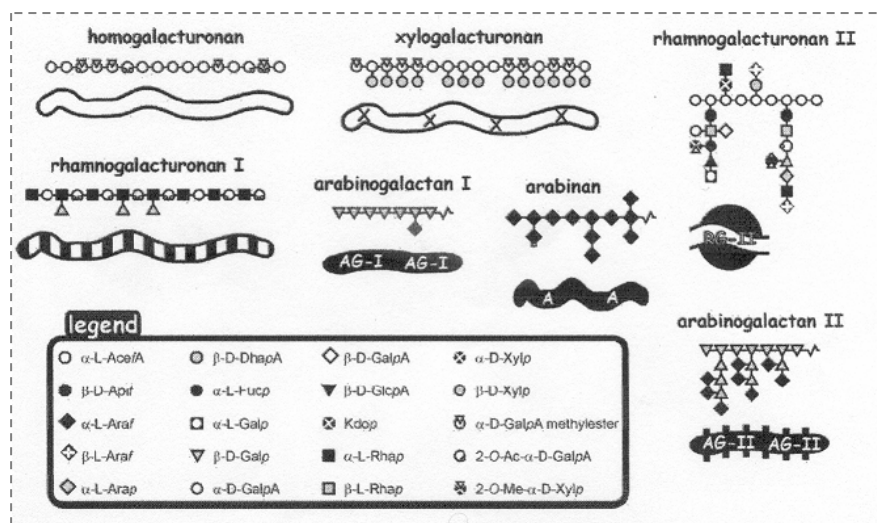
Depuis longtemps, les liens entre les diverses molécules pectiques sont décrits comme présentés figure 7 A, dans laquelle les HG et RG I forment un **squelette continu**. La caractéristique la plus importante de ce modèle est que le squelette pectique est constitué d'une longue chaîne comprenant le RG I (incluant les chaînes latérales de sucres neutres – non représentées), les HG (pouvant comporter des régions avec le RG II ou le XGA – non représentées), et des résidus rhamnose (isolés) espaçant les régions d'HG. Dans ce modèle, la liaison covalente entre les HG et RG I n'est pas discutée (Vincken *et al.*, 2003).

Il est probable que les HG et RG II soient liés de façon covalente puisqu'ils sont tous deux composés d'un squelette d'acides  $\alpha$ -D-galacturoniques liés en (1→4) et qu'ils sont solubilisés par un traitement des parois avec des endopolygalacturonases. Cependant, aucun oligosaccharide composé du squelette typique du RG I (répétitions du disaccharide acide  $\alpha$ -D-galacturonique/ $\alpha$ -L-rhamnose), lié de façon covalente aux HG, n'a jamais été isolé, et il n'existe aucune preuve de l'existence, *in muro*, de liens glycosidiques entre les HG et les chaînes latérales du RG I (Ridley *et al.*, 2001). Abdel-Massih *et al.* (2003) ont toutefois montré, par biosynthèse *in vitro*, que les chaînes de 1,4- $\beta$ -galactane (chaînes latérales du RG I) sont formées, attachées à un squelette pectique contenant à la fois de l'acide polygalacturonique (PGA) et du RG I.

En outre, la notion indiquant que les chaînes d'homogalacturonanes sont interrompues par l'insertion d'un résidu rhamnose entre des régions comportant 20 à 30 acides galacturoniques (Jarvis, 1984) est presque certainement incorrecte (Zhan *et al.*, 1998 – repris de Ridley *et al.*, 2001).

Récemment, Vincken *et al.* (2003) ont proposé un **modèle alternatif de la structure macromoléculaire de la pectine** (figure 7 B-D). La différence majeure entre ce modèle (toujours hypothétique) et celui présenté figure 7 A réside dans le fait que les HG sont décrits comme

étant des chaînes latérales du RG I. Les auteurs parlent de « brosses pectiques », les chaînes latérales étant les « poils » de la brosse, et pointant dans toutes les directions, perpendiculairement au squelette du RG I.



**Figure 7 :** représentation schématique de la structure macromoléculaire de la pectine. A : dans ce modèle, le squelette pectique est une longue chaîne comportant des régions HG et RG I (adapté de Visser & Voragen, 1996). Les régions HG peuvent être séparées par des résidus rhamnose. Les régions « lisses » sont principalement composées d'HG. Les régions « hérissées » sont constituées de RG I, XGA, arabinane, et AG I. Pour la simplicité, les XGA, arabinanes et AG I ne sont pas présentés. R : extrémité réductrice, NR : extrémité non réductrice. B-D : modèles pectiques dans lesquels le RG I est décoré par des chaînes latérales neutres (AG I, arabinanes, et peut-être AG II) et les HG/XGA (adapté de Voragen et al., 2003). Les symboles utilisés sont décrits dans l'encadré. Repris de Vincken et al., 2003.



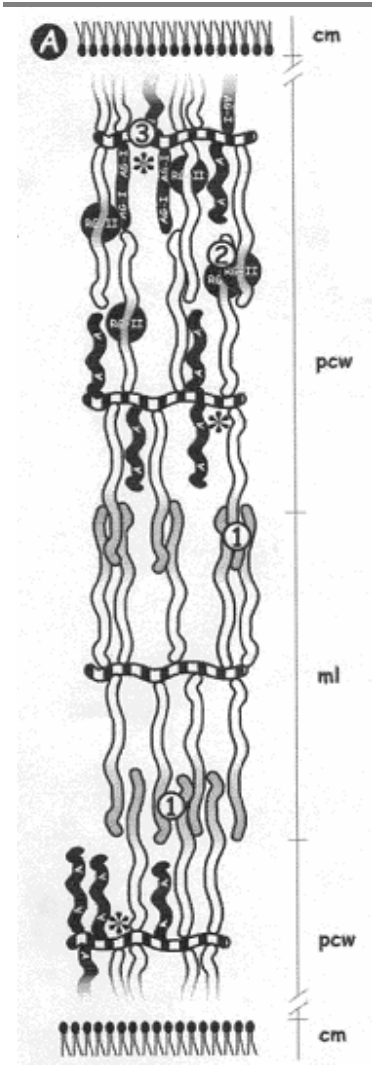
La nature exacte du point d'attache entre les HG et le RG I reste encore à établir, ainsi que la façon selon laquelle les différents « poils » sont attachés au squelette du RG I. En principe un grand nombre d'agencements différents sont possibles. Le RG I peut porter seulement un type de chaînes latérales (Fig. 7 B), présenter une distribution au hasard des « poils » (Fig. 7 C), une distribution en blocs de « poils » du même type (Fig. 7 D), ou encore une distribution en blocs de différents types de chaînes latérales (non présenté).

Il semble que la distribution en blocs des chaînes latérales sur le squelette du RG I soit la plus probable. Les chaînes latérales (HG, arabinanes, AG I et II) étant de nature très différente (charge et conformation), différents microenvironnements peuvent être créés dans la paroi en combinant différentes sortes de « poils ». Il est possible que ceci joue un rôle important dans la régulation des propriétés pariétales à différents stades de développement et dans divers tissus.

Dans les trois modèles de parois proposés par Cosgrove (2000a) (voir annexe 1), la pectine remplit les trous du réseau de cellulose-xyloglucane, et on accorde peu d'importance aux microdomaines et à la formation de la lamelle mitoyenne. Or, la pectine a un rôle beaucoup plus important que le simple remplissage des interstices du réseau de cellulose-xyloglucane.

Vincken *et al.* (2003) proposent un **nouveau modèle** (figure 8) **apportant des explications pour la formation de la lamelle mitoyenne et des microdomaines**, ainsi que pour le contrôle de l'épaisseur des parois. Selon ce modèle, les « brosses » de molécules pectiques riches en homogalacturonanes méthylestérifiés (sans arabinanes ni galactanes), sont déposées les premières au niveau de la plaque cellulaire entre deux cellules filles. Ensuite, des couches successives de molécules pectiques (en « brosses » elles aussi), sont ajoutées. Les « poils » constitués d'HG peuvent être désestérifiés par les PME, en bloc ou au hasard (Willats *et al.*, 2001b). Enfin, les

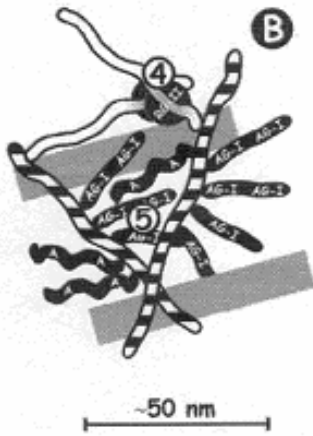
régions désestérifiées des HG (de différentes cellules) deviennent sensibles au  $\text{Ca}^{2+}$  et peuvent former un gel (indiqué par 1 dans la figure 8 A). Habituellement, la lamelle mitoyenne est formée par ce gel. Après que les premières couches de pectine aient été déposées, de nouveaux polymères (pectines et xyloglucanes) sont continuellement ajoutés de chaque côté du gel calcique (ou de son précurseur).



**Figure 8:** nouveau modèle de l'arrangement des pectines dans la lamelle mitoyenne et la paroi primaire.

A : vue latérale de deux parois primaires séparées par la lamelle mitoyenne.

- (1) Lamelle mitoyenne et gels calciques.
- (2) Interconnexion de deux couches de pectine par la dimérisation du RG II via le bore.
- (3) Le squelette du RG I est poussé contre les fibrilles de cellulose.



B : vue du dessus, en regardant de la membrane cellulaire vers la lamelle mitoyenne.

(4) Interconnexion du RG II entre deux couches de pectine ou entre molécules de la même couche.

(5) Les AG I et arabinanes remplissent les interstices de la paroi. Les régions désésterifiées des HG sont ombrées.

Barres grises : microfibrilles de cellulose (vue du dessus), \* : fibrilles de cellulose (section transversale), cm : membrane cellulaire, pcw : paroi primaire, ml : lamelle mitoyenne.

Les molécules pectiques fortement substituées par des chaînes latérales peuvent s'associer d'une façon ou d'une autre avec le réseau de cellulose-xyloglucane (Orfila *et al.*, 2002). Chez le tabac, les arabinanes pourraient jouer un rôle d'ancrage de la pectine dans la paroi (Iwai *et al.*, 2001), bien que ce ne soit pas le cas chez la pomme de terre (Skjøl *et al.*, 2002). Les galactanes pourraient, eux, jouer un rôle plus important dans le contrôle de la taille des pores de la paroi.

De plus, les diverses couches pectiques sont connectées entre elles, ce qui augmente la cohésion de la paroi. La liaison des chaînes du RG II *via* les ions bore joue un rôle prédominant dans la cohésion de la paroi primaire, par l'interconnexion de diverses couches pectiques (indiqué par 2 dans la figure 8 A).

Il est à noter que la composition des différentes couches pectiques change de la lamelle mitoyenne vers la membrane plasmique, ce qui est en accord avec la présence de microdomaines dans la paroi. Le RG II est absent de la lamelle mitoyenne, mais présent à travers la paroi primaire. Les galactanes et AG I sont probablement plus abondants à proximité de la membrane plasmique, alors que les arabinanes sont plus abondants dans la paroi en bordure de la lamelle mitoyenne.

Enfin, ce modèle est en accord avec d'autres observations indiquant que la présence réduite d'HG non estérifiés est corrélée à une réduction de l'adhésion cellulaire (Orfila *et al.*, 2002), et que l'épitope du RG II est absent de la région de la lamelle mitoyenne (Matoh *et al.*, 1998). Cet épitope pourrait toutefois être masqué par un composant soluble dans une base puisque le traitement alcalin des parois résulte en une importante augmentation du marquage (Matoh *et al.*, 1998).

## ● Réseau protéique

Trois classes majeures de protéines structurales de la paroi ont été identifiées : les extensines, les PRP et les GRP. Leur synthèse, tout comme l'établissement de liaisons entre ces protéines, sont strictement contrôlés en fonction du stade de développement, et peuvent être induits par un grand nombre de facteurs environnementaux (Carpita & Gibeaut, 1993 ; Keller, 1993).

### - Extensine et PRP

La protéine structurale majeure est l'extensine, aussi appelée HRGP (hydroxyprolin-rich glycoprotein). Il existe des preuves de l'existence de liens covalents entre le RG I et l'extensine chez le coton (Qi *et al.*, 1995 – repris de Willats *et al.*, 2001a). D'après Carpita & Gibeaut (1993), l'incorporation d'extensine dans la paroi prépare l'arrêt de la croissance. Les précurseurs seraient insérés dans la paroi pendant la division cellulaire et l'élongation mais ne pourraient pas réellement former un réseau renforçant la paroi avant l'insertion de PRP (ou RPRP – repetitive proline-rich protein), avec lesquelles l'extensine pourrait former un réseau d'hétéropeptides.

Une fois fixé dans cette conformation, le réseau de protéines remplace fonctionnellement les XG. Ces derniers peuvent ensuite être hydrolysés et recyclés sans que cela influence la forme de la cellule. De plus, l'extensine est généralement riche en Lys, ce qui lui confère un caractère basique, lui permettant

d'interagir avec les blocs pectiques acides dans la paroi (Reiter, 1998).

## - GRP

Les GRP (glycine-rich proteins) présentent la répétition Gly-Gly-X, où X est souvent la Gly. La GRP est supposée former une structure en forme de plaque à l'interface membrane plasmique/paroi. La face pariétale de ce feuillet présente une collection d'acides aminés aromatiques pouvant servir de sites d'initiation pour la lignification. Théoriquement, les GRP et les PRP pourraient interagir, à la façon de la PRP et de l'extensine.

## ■ Composition et localisation des pectines lors du développement

Notre compréhension des composants de la paroi, de leur arrangement au sein de celle-ci, ainsi que de leur contribution aux diverses fonctions que nous avons passées en revue est loin d'être complète. Les analyses de la **composition globale des polysaccharides** dans divers systèmes et des **types de liaison** impliquées (Femenia *et al.*, 1999 ; Stolle-Smits *et al.*, 1999 ; Satoh *et al.*, 1998 ; Iwai *et al.*, 2001, 2002), ainsi que l'analyse de **mutants** de la paroi (Reiter, 1998 ; Fagard, 2000), ont fourni d'importantes informations structurales. De telles études ont aussi montré l'importance des variations de composition des polysaccharides de la paroi au cours de phénomènes de développement très divers.

Les analyses de la composition en polysaccharides et des types de liaisons impliquées n'apportent toutefois pas d'informations sur les modulations possibles associées au développement cellulaire, ni sur la structure des pectines en relation avec l'architecture de cellules individuelles. Notre appréciation actuelle de la complexité et de la nature dynamique des parois primaires provient en grande partie des observations réalisées ces 10 dernières années avec l'aide d'**anticorps monoclonaux** dirigés contre une gamme de polysaccharides et de protéoglycanes. Ces anticorps sont des sondes importantes pour l'étude

de la fonction, l'organisation et l'architecture de la paroi cellulaire végétale dans un contexte développemental (Willats *et al.*, 1999a ; Willats *et al.*, 2000b). L'utilisation d'anticorps a l'avantage que l'épitope est une séquence oligomérique plutôt qu'un simple sucre ou un lien glycosidique (Femenia *et al.*, 1998).

Le continuels turn-over de la paroi indique que différents composants peuvent être incorporés dans la paroi à différents moments pendant la croissance et la différenciation (Gorshkova *et al.*, 1997). En plus de cette variation temporelle, il existe une variation, maintenant bien documentée, dans la localisation des différents composants entre cellules et entre différentes régions d'une même paroi (Dolan *et al.*, 1997 ; Bush & McCann, 1999 ; Femenia *et al.*, 1998). La paroi est donc une mosaïque de domaines avec différentes fonctions et compositions spécifiques (Guglielmino *et al.*, 1997b ; Bush & McCann, 1999) et les sondes immunologiques développées et à venir permettront de mieux les comprendre.

Dans ce chapitre, nous mettrons principalement l'accent sur les résultats obtenus dans différents systèmes avec les anticorps monoclonaux anti-pectines suivants :

#### - 2F4

Reconnaissant les homogalacturonanes sous leur conformation dimérique en « boîte à œufs » induite par une concentration optimale en calcium et sodium de 1 et 150 millinormal, respectivement (le 2F4 ne reconnaît par contre pas les chaînes isolées ni les associations multimériques d'homogalacturonanes) (Liners *et al.*, 1989). Un DP minimal de 9 est nécessaire à la reconnaissance par le 2F4 - le degré d'estérification maximal, permettant encore la reconnaissance par l'anticorps, est de 30 % pour la pectine désestérifiée au hasard (par des PME fongiques) et de 40 % pour la pectine désestérifiée par blocs (par des PME végétales) (Liners *et al.*, 1992).

- **JIM5 et JIM7 (Knox *et al.*, 1990)**

Reconnaissant tous deux une large gamme d'oligosaccharides méthylestérifiés, en préférence à des échantillons désestérifiés (DE allant jusqu'à 76 % environ – Willats *et al.*, 1999 a, 2000a).

L'analyse de l'épitope optimal de JIM5, utilisant des hexagalacturonides comme inhibiteurs, a montré que ce dernier contient plus de trois résidus non estérifiés adjacents à (ou flanqués par) des résidus méthylestérifiés (Clausen *et al.*, 2003). Cependant, il peut aussi comporter d'autres épitopes conformationnels présents dans un polymère. Signalons également que contrairement à JIM7, JIM5 est capable de reconnaître un nonagalacturonide non estérifié.

Par contre, l'épitope de JIM7 est constitué par des résidus méthylestérifiés, adjacents à (ou flanqués par) des résidus non estérifiés (Clausen *et al.*, 2003), ce qui confirme les précédents rapports indiquant que JIM7 reconnaît un épitope de pectines relativement fortement méthylestérifiées, alors que JIM5 reconnaît un épitope relativement faiblement méthylestérifié.

- **LM7 (Willats *et al.*, 2001b)**

Reconnaissant un épitope des HG généré par une désestérification au hasard des pectines par des PME fongiques. Il nécessite quatre résidus acides galacturoniques non estérifiés, flanqués par des groupements méthylesters. Cet épitope est également reconnu par JIM5 (Clausen *et al.*, 2003). En outre, la liaison de LM7 est indépendante de l'association intermoléculaire des chaînes d'HG par l'intermédiaire du  $\text{Ca}^{2+}$  (Willats *et al.*, 2001b).

- **LM5**

Anti-(1→4)-β-D-galactane (4 résidus), chaîne latérale du RG I (Jones *et al.*, 1997).

- **LM6**

Anti-(1→5)- $\alpha$ -L-arabinane (5 résidus), autre chaîne latérale du RG I (Willats *et al.*, 1998).

- **PAM1**

Reconnaissant de longs blocs d'acides homogalacturoniques désésterifiés et non substitués, générés par l'action de PME végétales. On observe une forte corrélation inverse entre la liaison de PAM1 et le DE de la pectine. La liaison optimale de l'anticorps nécessite un minimum de 30 acides galacturoniques, ce qui est considérablement plus grand que les 3-6 monosaccharides que l'on pense être généralement reconnus par les anticorps monoclonaux. Le calcium favorise la liaison de PAM1 aux homogalacturonanes mais, contrairement au 2F4, n'est pas indispensable. PAM1 reconnaît une conformation particulière des homogalacturonanes nécessitant de longs DP, mais différente de la conformation en « boîte à œufs » reconnue par le 2F4 (Willats *et al.*, 1999a).

Tous ces anticorps ont été produits par la technique des hybridomes. Excepté PAM1, généré par la technique du phage display.

## Homogalacturonanes

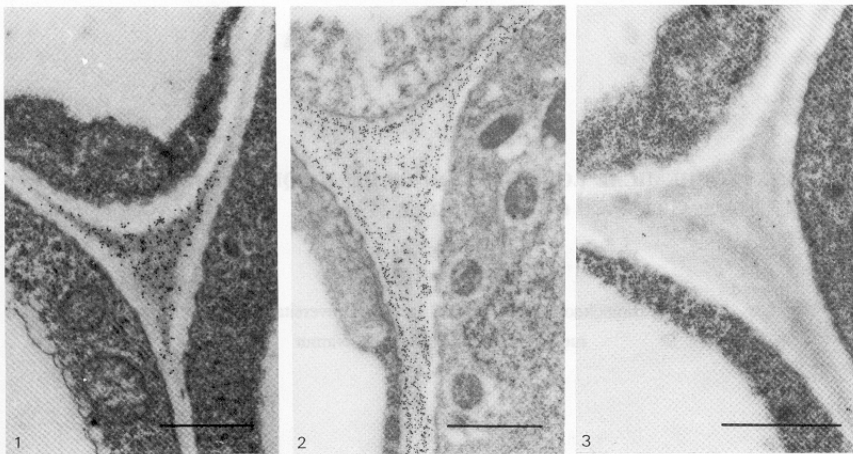
La capacité des HG à participer à la formation de gels et à contribuer à l'épaisseur de la paroi est largement régulée *in muro* par l'action des pectine méthylestérases (PME). Toutefois, on ne connaît pas grand-chose de leur biosynthèse et différents schémas de méthylestérification obtenus au cours de cette synthèse peuvent également conduire à divers états de méthylestérification des HG *in muro* (Willats *et al.*, 2001a). En effet, l'existence, en plus de la voie principale de sécrétion de pectines hautement méthylestérifiées, d'une voie de sécrétion alternative et secondaire pour les pectines acides a déjà été postulée par Roberts (1990). Un marquage significatif est en outre observé dans certains dictyosomes avec JIM5, suggérant l'exocytose de polymères faiblement méthylestérifiés vers la paroi (Guglielmino *et al.*, 1997a et b).



## ● Variations du degré d'estérification

- La distribution hétérogène des acides polygalacturoniques observée au sein de la paroi semble être liée à des différences au niveau du degré d'estérification des pectines pariétales.

L'analyse en microscopie électronique de la répartition de l'épitope reconnu par le 2F4 sur coupes de suspensions cellulaires de carottes (Liners & Van Cutsem, 1991), a montré que des pectines acides (gels calciques) sont présentes au niveau de la lamelle mitoyenne s'étendant dans les zones de jonction intercellulaires, ainsi que sur les bords des parois proches des espaces intercellulaires et sur la surface des parois exposées au milieu de culture, mais pas dans les parois primaires (figure 9). Toutes ces régions marquées contiennent un matériel dense aux électrons, tandis que les régions d'apparence claire sont dépourvues de particules d'or. Toutefois, après traitement alcalin - permettant la désestérification des pectines *in situ* et donc la mise en évidence par le 2F4 de pectines initialement estérifiées - le marquage s'étend aux parties perméables aux électrons, plus claires.



**Figure 9 :** détection de l'acide polygalacturonique sur micrographies électroniques de sections ultrafines de LR White (suspensions cellulaires de carottes), par incubation avec le 2F4 (et un anticorps secondaire anti-souris couplé à des grains d'or de 10 nm – Barres : 1  $\mu$ m). (1) Marquage des zones de jonction intercellulaires avant désestérification. (2) Marquage des zones de jonction intercellulaires après désestérification. (3) Contrôle après désestérification (incubation avec l'anticorps secondaire uniquement). (Cy : cytoplasm, J : zone de jonction intercellulaire, V : vacuole).

Une répartition similaire des HG a également été observée dans les tubercules de pomme de terre (Bush & McCann, 1999 ; Bush *et al.*, 2001). Ainsi, les pectines estérifiées (JIM7) sont abondantes et distribuées de façon similaire dans toutes les parois des cellules parenchymateuses, alors que les pectines acides (JIM5 et 2F4) sont principalement localisées au niveau de la lamelle mitoyenne et sont abondantes au niveau des zones de jonction.

- Les polymères pectiques sont synthétisés et sécrétés sous forme hautement méthylestérifiée.

Les travaux de Liners & Van Cutsem (1992) sur des microcolonies de cellules de carottes ont montré que dans les cellules jeunes ou matures, outre la répartition du marquage décrite ci-dessus, la lamelle mitoyenne loin des zones de jonction et des espaces intercellulaires n'est pas reconnue par l'anticorps. De plus, un marquage n'est présent au niveau des corpuscules de golgi et des vésicules associées qu'après désestérification.

- Une diminution de l'estérification des pectines est observée pendant la croissance, la différenciation et la sénescence des cellules.

D'après Liners & Van Cutsem (1992), cette réduction résulte probablement de la désestérification enzymatique (PME) des polymères pectiques des parois primaires. De plus, les auteurs ont détecté moins de dictyosomes marqués dans les cellules les plus vieilles, ce qui indique un turn-over plus lent des pectines. Une diminution basipète du degré de méthylestérification (DM) des polysaccharides pectiques tout au long de la tige a également été montrée chez le chou-fleur (Femenia *et al.*, 1999), ainsi que dans les stolons de pomme de terre en élongation (Bush *et al.*, 2001).

- Ces différences dans le DM peuvent être localisées au niveau de tissus spécifiques.

Femenia *et al.* (1998) ont montré chez le chou-fleur que le DM est plus élevé dans le parenchyme de la moëlle du haut de la tige que dans les tissus floraux. La réduction du DM est aussi associée au cylindre vasculaire entourant le parenchyme de la moëlle. Ceci est

également bien illustré dans les stolons de pomme de terre (Bush *et al.*, 2001).

- Des variations du DM sont observées en relation avec des types cellulaires particuliers.
  - **JIM5**, reconnaissant les épitopes pectiques relativement faiblement méthylestérifiés, ***permet de distinguer les cellules en division (méristématiques) des cellules ne se divisant pas*** (cellules centrales du centre quiescent) dans la pointe de la racine d'*Arabidopsis* (Dolan *et al.*, 1997). Les parois des cellules ne se divisant pas contenant de plus grandes quantités de pectines relativement faiblement méthylestérifiées que celles des cellules en division, alors qu'il y a peu de variations dans la fraction de pectines relativement méthylestérifiées (JIM7) des deux types cellulaires. Cette abondance de pectines relativement faiblement estérifiées est caractéristique d'autres cellules ne se divisant pas (ou stationnaires) et pourrait jouer un rôle important au niveau des propriétés rhéologiques des parois de ces cellules.
  - De plus, la distribution de la pectine et la localisation du calcium dans **les cellules entrant dans la voie phloémienne de différenciation sont différentes de celles entrant dans la voie xylémienne** (Guglielmino *et al.*, 1997b). Dans les parois en croissance des dérivés xylémiens, les pectines relativement faiblement estérifiées (JIM5) sont confinées aux jonctions intercellulaires et à la lamelle mitoyenne, occasionnellement accompagnées d'ions calcium. Cette plasticité de la paroi doit faciliter la croissance en diamètre et les nécessaires ajustements entre cellules voisines. Par contre, dans les cellules en différenciation et les cellules matures du phloème, les pectines (relativement) acides (détectées par JIM5) et le  $\text{Ca}^{2+}$  sont présents dans toutes les parois, conduisant à un épaissement précoce du réseau polysaccharidique. La croissance relativement faible des vaisseaux phloémiens pendant leur différenciation pourrait donc résulter de cet épaissement. Aux jonctions intercellulaires, les pectines faiblement estérifiées pourraient provenir de l'activité de

PME localisées dans ces zones. Comme montré par les résultats de Guglielmino *et al.* (1997a), concernant l'immunodétection de PME et indiquant une distribution différentielle de ces enzymes dans les cellules cambiales et leurs dérivés.

## ● Formation de gels et intégrité de la paroi

Il existe certaines contradictions dans la littérature sur le rôle de la pectine dans l'adhésion cellulaire. Ainsi, les HG faiblement méthylestérifiés détectés par JIM5 et le 2F4 sont plus souvent associés à la séparation des cellules au niveau de la lamelle mitoyenne qu'à l'adhésion cellulaire. Mais l'ensemble des résultats indique quand même que la pectine est un bon candidat pour l'adhésion cellulaire, à condition de tenir compte de la diversité des liens possibles entre les diverses molécules pectiques.

### □ Gels calciques

La formation de gels est probablement importante pour le maintien de l'intégrité de la paroi, à la fois dans une couche cellulaire et à l'intérieur de celle-ci, ainsi qu'au niveau de la lamelle mitoyenne. Ainsi, sur des sections de cotylédons d'*Arabidopsis thaliana*, PAM1 - reconnaissant un minimum de 30 résidus d'acides galacturoniques désestérifiés et non substitués - se lie principalement aux jonctions intercellulaires, alors que le marquage est absent ou faible au niveau des parois n'adhérant pas à celles des cellules voisines (Willats *et al.*, 1999a). De façon similaire, le marquage est absent des régions « non adhérentes » des parois dans les massifs cellulaires de cultures en suspension d'*Arabidopsis*.

Lorsqu'on transforme des disques foliaires provenant de plantes haploïdes de *Nicotiana plumbaginifolia* Viv., avec l'ADN-T, et qu'on les cultive ensuite sur un milieu induisant la formation de tiges, des cals mutants - non organogènes et désignés *nolac* (pour *non organogenic callus with loosely attached cells*) - apparaissent sur environ 7 % des disques foliaires.

Iwai *et al.* (2001) ont montré en microscopie électronique (utilisant la coloration au rouge de ruthénium – colorant chargé positivement, interagissant ioniquement avec des polysaccharides polyanioniques) que des pectines faiblement méthylestérifiées, composées probablement d’HG ou de RG, sont présentes dans la lamelle mitoyenne des cals normaux. Les pectines fortement méthylestérifiées sont présentes sur toute l’étendue de la paroi de ces cals. Par contre, dans les parois cellulaires des cals *nolac-H14*, on assiste à une réduction considérable du niveau de ces polysaccharides pectiques, corrélée à une réduction de l’adhésion cellulaire.

Nous avons vu plus haut que dans les stolons de pomme de terre en élongation (Bush *et al.*, 2001), les populations les plus jeunes de cellules sont enrichies en HG hautement méthylestérifiés (JIM7), tandis que les pectines faiblement estérifiées (JIM5 et 2F4) sont plus abondantes dans les parois des plus vieilles cellules en élongation, proximales au coude du stolon. Les faibles teneurs en épitopes de pectines faiblement méthylestérifiées pourraient indiquer le peu de zones de jonction entre molécules d’HG dans la zone de tubérisation, excepté au niveau des jonctions entre trois cellules. Une telle architecture pourrait contribuer à l’expansion cellulaire initiale marquant le début de la tubérisation (croissance isodiamétrique des cellules).

Les sites de liaison du  $\text{Ca}^{2+}$  sont par contre présents uniformément dans les parois du stolon<sup>6</sup>, mais leur densité totale est réduite et ils sont confinés à quelques jonctions cellulaires dans les tubercules matures. Ce changement pourrait permettre de combattre le stress de séparation des cellules par la formation de « zones de renforcement » au niveau des jonctions.

Dans les tubercules matures, l’abondance de l’épitope du 2F4 au niveau des vaisseaux vasculaires confère une grande cohésion qui pourrait permettre aux cellules des différents faisceaux de rester

<sup>6</sup> Les épitopes des trois anticorps anti-HGA peuvent lier le  $\text{Ca}^{2+}$ , mais la quantité et la force de liaison, ainsi que la capacité de ces liaisons à rigidifier les chaînes pectiques, augmentent toutes dans l’ordre JIM7 < JIM5 < 2F4.

groupées en différentes unités lors de la croissance de la zone pérимédullaire (Bush & McCann, 1999).

#### □ **Autres gels...**

- Dans de nombreux cas, des facteurs s'ajoutant à la liaison intermoléculaire par les ions  $\text{Ca}^{2+}$  sont responsables du maintien de l'intégrité du réseau pectique (Jarvis, 1984 ; Willats *et al.*, 2001a).

Liners & Van Cutsem (1991, 1992) ont en effet montré que les pectines méthylestérifiées sont majoritaires dans les régions à grande capacité d'adhésion, comme la lamelle mitoyenne loin des zones de jonction intercellulaire, alors que les pectines acides sont localisées dans des régions où la cohésion est plus faible ou en bordure des espaces intercellulaires. Rappelons de plus ici que l'épitope reconnu par PAM1 ne nécessite pas la présence d'ions calcium, même si celle-ci favorise sa reconnaissance. L'association de l'épitope de PAM1 aux régions adhérentes des parois n'implique donc pas les gels calciques de façon obligatoire, même si c'est une possibilité.

- Dans les cellules du cortex des fruits de pomme, les complexes plasmodesmes-parois sont entourés d'un microdomaine pectique composé d'HG faiblement méthylestérifiés, qui ne sont pas impliqués dans la liaison intermoléculaire du  $\text{Ca}^{2+}$ , mais sont probablement entourés par un environnement cationique (Roy *et al.*, 1997).

Ce dernier pourrait être **constitué de polyamines**, molécules cationiques capables de former des liens électrostatiques avec les composants de la pectine. Ces caractéristiques structurales pourraient empêcher la séparation normale des parois dans les régions des plasmodesmes. Les enzymes pectolytiques pourraient de plus être inhibées par ce microenvironnement ionique. Casero & Knox (1995) (repris de Willats *et al.*, 2000b) ont également montré la présence d'HG au niveau des « pit fields<sup>7</sup> » des parois primaires.

---

<sup>7</sup> « pit fields » : ces régions peuvent être comparées à des points de soudure qui protègent le délicat plasmodesme des dommages que pourrait lui infliger l'expansion cellulaire (Bush & McCann, 1999).

Signalons toutefois que dans les tubercules de pomme de terre, des gels calciques (détectés par le 2F4) sont présents au niveau des régions entourant les plasmodesmes, et sont supposés permettre le renforcement de ces zones (Bush & McCann, 1999 ; Bush *et al.*, 2001).

- ▶ Des structures pectiques supramoléculaires pourraient être générées à partir d'HG hautement méthylestérifiés, ou encore par l'interaction avec d'autres composants tels que la cellulose.

Willats *et al.* (2001c) ont développé une technique de marquage immunofluorescent par immersion pour l'analyse *in situ* des polysaccharides pectiques en surface de plantules d'*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Ces auteurs ont notamment montré l'absence de l'épitope de JIM5 (pectines relativement faiblement estérifiées) au niveau des apex des racines latérales. La forte cohésion des cellules à ce niveau semble donc dépendre également d'autres types de gels que ceux impliquant les pectines faiblement estérifiées.

## □ Facteurs favorisant la séparation cellulaire

- ▶ L'acétylation et la substitution des HG par le xylose semblent influencer la structure de ces molécules pectiques, favorisant la séparation cellulaire.

Liners *et al.* (1994) ont étudié l'**acétyl-** et la **méthyl-estérification** des pectines de cals friables et compacts de betteraves. Les cals compacts contiennent trois types de pectines différentes :

- Les **pectines acides** - reconnues directement par le 2F4 - présentes dans les aires de séparation cellulaire mais jamais au niveau de la lamelle mitoyenne de cellules fortement associées. Ce qui confirme les précédents résultats montrant que la cohésion des cellules n'est pas essentiellement dépendante de la complexation des pectines par les ions calcium.
- Les **pectines hautement méthylestérifiées** - reconnues par le 2F4 après désestérification enzymatique (PME) - localisées principalement au niveau des jonctions intercellulaires et de la

lamelle mitoyenne dans la zone centrale du cal où les cellules sont fortement associées.

- Les **pectines largement méthyl- et acétyl-estérifiées** - détectées par le 2F4 après désestérification chimique au NaOH - localisées dans toutes les parois primaires des cals compacts.

Par contre toutes les pectines des cals friables sont largement méthyl- et acétyl-estérifiées.

La friabilité des cals de betterave est donc corrélée à une augmentation de l'acétylestérification des pectines - vérifiée par méthode analytique - sans pour autant que l'on puisse établir de relation de cause à effet. Lorsque la composition de la paroi induit une altération de la texture du tissu, comme dans les cals friables de betterave, les cellules ne se différencient plus et on ne trouve plus que des cellules en division active, ce qui illustre l'importance d'une forte adhésion cellulaire et d'une expansion cellulaire limitée pour les stades précoces de la morphogenèse, observée au niveau des méristèmes.

Bien que la méthylestérification empêche la formation de gels calciques, l'association de chaînes d'HG fortement méthylestérifiés peut par contre aussi contribuer à la formation de gels pectiques *in planta* et à la cohésion pariétale (Jarvis, 1984 ; Willats *et al.*, 2001a).

Enfin, l'épitope des *xylogalacturonanes* (reconnu par l'anticorps LM8) est spécifiquement associé au processus de séparation cellulaire chez le pois (Willats *et al.*, 2004).

## ● Rôle des PME – le cas des zones de jonction intercellulaires

Nous avons vu plus haut que la capacité des HG à participer à la formation de gels, et ainsi à contribuer à l'épaississement de la paroi est largement régulée *in muro* par l'action des PME. Il est maintenant clair que les isoformes de PME peuvent avoir différents modes d'action sur les HG, influencés notamment par le degré de



méthylestérification du substrat ainsi que par le pH (Ridley *et al.*, 2001).

► Les PME semblent avoir deux types de mode d'action :

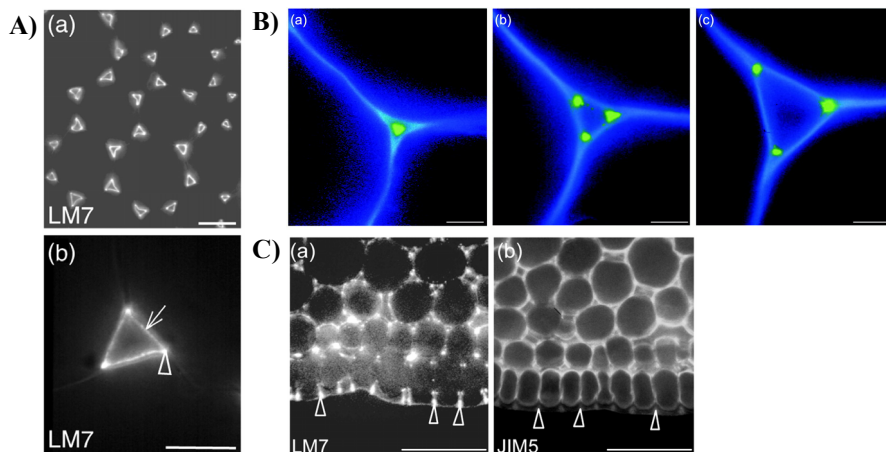
- Le premier est une **action « en blocs »**, dans laquelle l'enzyme enlève les groupements méthyles de résidus d'acides galacturoniques contigus sur un squelette d'HG, ce qui résulte en la formation de blocs relativement longs de résidus désestérifiés. On pense que ce mode d'action est le mécanisme prédominant des PME végétales. Les premières études utilisant PAM1, qui reconnaît de tels blocs de résidus désestérifiés ont indiqué que ces blocs d'HG sont présents dans des régions distinctes de la paroi, souvent au niveau des jonctions cellulaires (Willats *et al.*, 1999a).
- Les PME sont aussi produites par certains pathogènes végétaux, mais on pense que le mode d'action prédominant de ces PME microbiennes est une **désestérification « au hasard »**, ce qui résulte en l'enlèvement d'un seul groupement méthylester à la fois, ou d'un nombre limité de ces groupements.

Willats *et al.* (2001b) ont identifié un épitope des HG (détecté par l'anticorps monoclonal LM7) produit *in vitro* par l'action « au hasard » d'une PME d'*Aspergillus* ainsi que par une désestérification alcaline, mais pas par l'action « en blocs » d'une PME végétale. Toutefois, cet épitope est présent *in planta* et, plus particulièrement, aux coins des espaces intercellulaires et à la jonction entre cellules dans un grand nombre d'espèces (figure 10 A), ce qui suggère que certains processus *in vivo* produisent cet épitope.

---

Les PME végétales seraient donc également capables d'effectuer une désestérification « au hasard » des pectines.

---



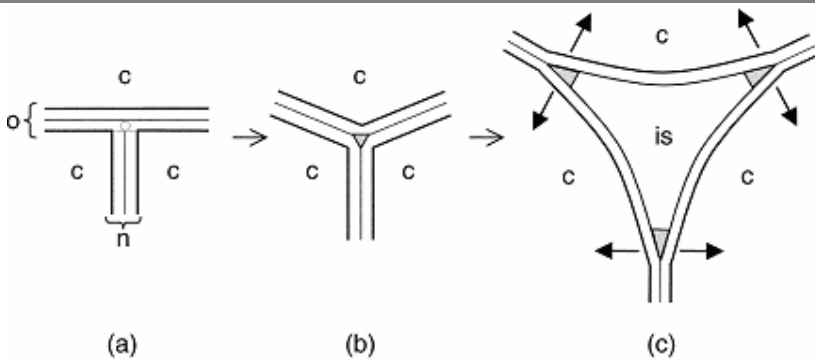
**Figure 10 :** l'épitope des HG reconnu par LM7 est présent au niveau des jonctions intercellulaires, ainsi que tout au long de leur formation. A. Micrographie montrant la liaison de LM7 au niveau des jonctions intercellulaires dans le parenchyme cortical de la tige de pois. Barre d'échelle en (a)=100  $\mu$ m, et en (b)=20  $\mu$ m. Les têtes de flèche et flèche en (b) indiquent les coins et bordures des espaces intercellulaires, respectivement. B. Micrographie montrant le double marquage des parois cellulaires du parenchyme cortical de tige chez le pois, avec LM7 (marquage immunofluorescent – vert) et le calcofluor (liant la cellulose – bleu), et montrant la position de l'épitope des HG et de la cellulose en relation avec les espaces intercellulaires à différentes étapes de leur formation. Barre d'échelle=5  $\mu$ m. C. Micrographies montrant la liaison de LM7 (a) et JIM5 (b) aux parois des cellules épidermiques de tige chez le pois. Les têtes de flèches indiquent la position d'une région de la paroi cellulaire externe de l'épiderme, recouvrant les jonctions cellulaires. Barre d'échelle en (a)=50  $\mu$ m, et en (b)=10  $\mu$ m. Repris de Willats et al. (2001b).

- Les PME ont la potentialité de modifier localement ou de contrôler très finement les propriétés de la matrice pectique, au niveau de régions particulières de la paroi cellulaire (microdomaines) et en réponse à des nécessités fonctionnelles.

L'épitope de LM7 est présent tout au long de la formation des espaces intercellulaires chez le pois (figure 10 B). Il semble plus abondant dans les régions où s'étend la lamelle mitoyenne, au point de séparation des cellules, lors de la formation des méats. Il est également détecté au niveau de la paroi externe, épaissie, des cellules épidermiques de la tige (figure 10 C). Par contre, l'épitope de JIM5 est présent au niveau des parois radiales mais absent des régions liant LM7.

De plus, des analyses *in vitro* de la pectine modèle F31 (désestérifiée par des PME fongiques – voir Willats *et al.*, 2000a) contenant d'importantes quantités de l'épitope LM7 (mais de faibles niveaux de l'épitope PAM1), indiquent qu'elle peut former un gel calcique ayant une élasticité, des propriétés compressives, une capacité de rétention d'eau et une porosité différentes de celles des pectines contenant de grandes quantités de l'épitope PAM1 (Willats *et al.*, 2001b).

Il semble que ce domaine des HG, présentant une distribution « au hasard » des groupements méthylesters (et par conséquent des propriétés particulières) ait un rôle précis associé à l'adhésion des cellules au niveau des jonctions intercellulaires. La force conduisant à la formation des espaces intercellulaires est la pression de turgescence, produisant des forces de tension dans les parois et favorisant la réduction du volume des cellules et donc une forme sphérique.



**Figure 11 :** diagramme schématisant la présence de l'épitope LM7 en relation avec les jonctions cellulaires et la formation des espaces intercellulaires. (a) L'espace intercellulaire se forme à la jonction entre de vieilles (o) et de nouvelles (n) parois cellulaires et implique la réunion de la lamelle mitoyenne. Ceci requiert le démantèlement d'une région de la plus vieille paroi (indiqué par un cercle pointillé). (b) Une jonction intercellulaire non encore étendue sans espace d'air. Le triangle gris indique la position du matériel de la lamelle mitoyenne en expansion, occupant complètement l'espace et correspondant à la position du marquage LM7. (c) Une jonction cellulaire après expansion avec un grand espace intercellulaire (is). Les flèches indiquent les forces de tension générées par la pression de turgescence intercellulaire conduisant à la séparation des cellules. Les triangles gris indiquent les régions correspondant à la liaison de LM7. Dans tous les cas, (c) indique l'intérieur des cellules, les lignes épaisses indiquent le côté de la paroi en contact avec la membrane plasmique et les lignes minces la position de la lamelle mitoyenne. Repris de Willats *et al.* (2001b).

Pour initier la formation des espaces, une région de la paroi primaire doit d'abord être démantelée afin de permettre à la lamelle mitoyenne de se rejoindre (figure 11). Les espaces intercellulaires résultent alors d'une scission contrôlée de la lamelle mitoyenne. Comme les espaces se développent, les stress deviennent plus importants au niveau des régions où les parois sont encore adhérentes, bordant celles où les parois sont déjà séparées et l'espace intercellulaire.

---

Les pectines contenant l'épitope LM7 peuvent avoir un rôle direct dans le maintien des liens de cellule à cellule en ces points de forte tension, par l'intermédiaire de gels calciques, et peuvent fournir un environnement approprié pour les processus permettant le maintien des contacts de cellule à cellule.

---

## Chaînes latérales du RG I

---

- Les chaînes d'arabinanes semblent être un marqueur de la prolifération cellulaire alors que celles de galactanes sont plutôt associées à l'élongation et la différenciation des cellules.

Ces résultats proviennent notamment des travaux de Willats *et al.* (1999b), qui ont étudié la présence et la fonction des chaînes latérales des domaines RG I des polysaccharides pectiques pendant le développement de cellules de carottes, utilisant les anticorps anti-(1→4)-β-D-galactanes (LM5) et anti-(1→5)-α-L-arabinanes (LM6). Deux systèmes différents ont été employés, permettant la distinction entre cellules en prolifération ou en élongation/différenciation: des apex racinaires et des cultures de cellules en suspension, pouvant être induite à passer de l'état de prolifération à celui d'élongation cellulaire par ajout de 2,4-D.

Les travaux de McCartney *et al.* (2000) sur le pois ainsi que ceux de Bush *et al.* (2001) sur les stolons de pomme de terre en élongation, indiquent également que la présence des (1→5)-α-arabinanes pectiques est associée aux tissus jeunes alors que les (1→4)-β-galactanes pectiques apparaissent plus tardivement.

- Les pectines riches en arabinose, fortement associées avec les complexes cellulose-hémicellulose, pourraient jouer un rôle important dans l'attachement intercellulaire et ainsi dans l'architecture de la paroi (Sato *et al.*, 1998; Iwai *et al.*, 2001).

En effet, les faibles taux de résidus arabinose dans les polysaccharides pectiques de la fraction hémicellulosique des cals *nolac-H14*, présentant une faible adhésion cellulaire, indiquent qu'il n'y a pas de chaînes latérales de sucres neutres, composées principalement d'arabinanes linéaires, dans ce type de cals (Iwai *et al.*, 2001).

De telles chaînes latérales sont connues comme étant beaucoup plus flexibles que le composant HG formant le squelette des polysaccharides pectiques. Ainsi, l'épitope de LM6 est exclu de la lamelle mitoyenne s'étendant dans les zones de jonction des tubercules de pomme de terre matures où la cohésion est faible (Bush *et al.*, 2001).

- L'interaction des chaînes latérales d'arabinanes avec d'autres composants pectiques ou polysaccharidiques pourrait compenser l'absence de gels calciques et favoriser le renforcement des « pit fields ».

On observe en effet que l'épitope des (1→4)-β-galactanes est absent de la région des plasmodesmes dans les péricarpes des fruits de tomate (Orfila & Knox, 2000), alors que celui des (1→5)-α-arabinanes est présent de façon plus abondante sur la face interne des parois dans les régions entourant les plasmodesmes. L'épitope des galactanes (LM5) diminue également au niveau des « pit fields » dans les tubercules matures de pomme de terre (Bush & McCann, 1999).

- Les chaînes latérales peuvent être impliquées dans la modulation de l'alignement des HG et ainsi contribuer à la régulation de la porosité de la matrice pariétale (Willats *et al.*, 1999b). La présence de chaînes latérales attachées aux domaines RG I pourrait influencer l'accès de protéines, capables de modifier les propriétés pariétales, à leurs sites d'action au sein de la matrice.

Ainsi, la rareté des épitopes LM5 et LM6 au niveau de la zone de tubérisation des stolons de pomme de terre pourrait indiquer une augmentation de la porosité des parois (Bush *et al.*, 2001).

- Des tests de compression mécanique des cotylédons de pois, avant et après apparition des (1→4)- $\beta$ -galactanes, indiquent que les cotylédons dont la paroi cellulaire est enrichie en galactanes sont deux fois plus résistants que ceux dépourvus de galactanes (McCartney *et al.*, 2000).

De plus, la présence des galactanes sur la face interne de la paroi cellulaire pourrait être liée au fait que les forces de tension sont maximales à ce niveau et plus faibles au niveau de la lamelle mitoyenne. L'observation de galactanes (LM5) le long du plasmalemme dans le cortex des tubercules de pomme de terre, ainsi qu'au niveau des vaisseaux vasculaires vont également dans ce sens (Bush & McCann, 1999).

# Les pectine méthylestérases

---

Les pectine méthylestérases (PME) sont des enzymes pariétales présentes chez presque toutes les plantes et les microorganismes phytopathogènes.

Chez les dicotylédones, les PME sont des enzymes ubiquistes impliquées dans d'importants processus de développement. Elles jouent un rôle essentiel dans divers phénomènes physiologiques tels que la régulation du pH de la paroi (Nari *et al.*, 1986), la modification des pectines et de l'intégrité des tissus, ainsi que la liaison de cations (Tieman *et al.*, 1992 ; Pilling *et al.*, 2000).

Elles sont associées à :

- la croissance (Moustacas *et al.*, 1991 ; Goldberg *et al.*, 1995 ; Pilling *et al.*, 2000)
- l'adhésion cellulaire (Wen *et al.*, 1999 ; Stephenson & Hawes, 1994)
- la maturation des fruits (Tucker *et al.*, 1982 ; Gaffé *et al.*, 1994 ; Recourt *et al.*, 1992 ; Christensen *et al.*, 1998)
- la microsporogénèse et la croissance du tube pollinique (Li *et al.*, 2002 ; Lacoux *et al.*, 2003 a et b)
- le développement des tissus vasculaires (Guglielmino *et al.*, 1997a ; Alexandre *et al.*, 1997 ; Micheli *et al.*, 2000)
- la germination de la graine (Ren & Kermode, 2000)
- la production de méthanol (Frenkel *et al.*, 1998 ; Hasunuma *et al.*, 2003)
- la tolérance à des minéraux ou des toxines (Schmol *et al.*, 2000)

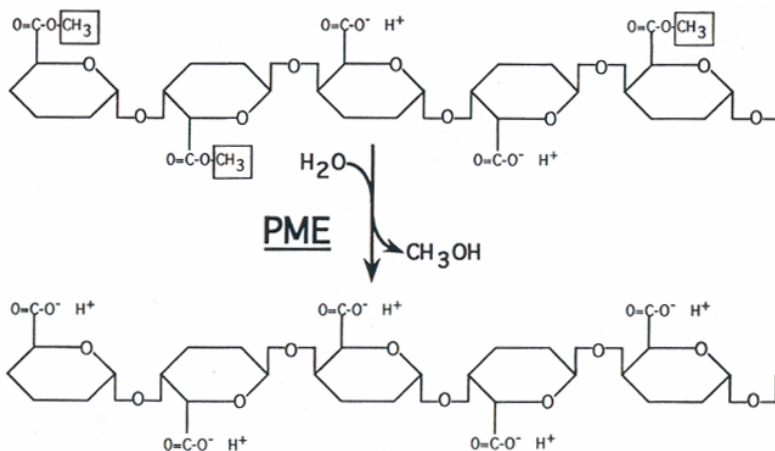
Enfin, les PME végétales jouent également un rôle dans la dissémination des virus. Leur interaction avec les protéines de mouvement du TMV (Tobacco Mosaic Virus) est en effet requise pour le mouvement viral de cellule à cellule au travers des plasmodesmes (Dorokhov *et al.*, 1999 ; Chen *et al.*, 2000).

Chez les microorganismes, les PME sont généralement sécrétées lors du processus d'infection, en même temps que d'autres enzymes dégradant la paroi végétale, facilitant ainsi l'invasion du pathogène.

Nous avons vu précédemment que les pectines sont sécrétées dans la paroi sous forme hautement méthylestérifiée. Elles sont polymérisées dans le golgi *cis*, méthylestérifiées dans le golgi médian et substituées par des chaînes latérales dans les citernes du golgi *trans*. Ensuite, elles peuvent être modifiées par des pectinases telles que les PME. Ces dernières, par déméthylestérification, génèrent des groupes carboxyliques libres le long du squelette des polygalacturonanes et libèrent des protons dans l'apoplasme (figure 12).

- Leur action peut donc conduire à des effets antinomiques, spécialement dans les parois primaires.

D'un côté, la diminution de pH pourrait stimuler les enzymes clivant les liens porteurs du réseau polysaccharidique et ainsi augmenter l'extensibilité pariétale. Mais, d'un autre côté, la génération de blocs d'acides carboxyliques pourrait permettre la formation de structures en multichaînes par l'intermédiaire d'ions calcium. De telles structures affectent fortement les propriétés physiques de la pectine, diminuant la porosité et l'extensibilité pariétale.



**Figure 12 :** réaction de la pectine méthylestérase (repris de Bordenave, 1996).

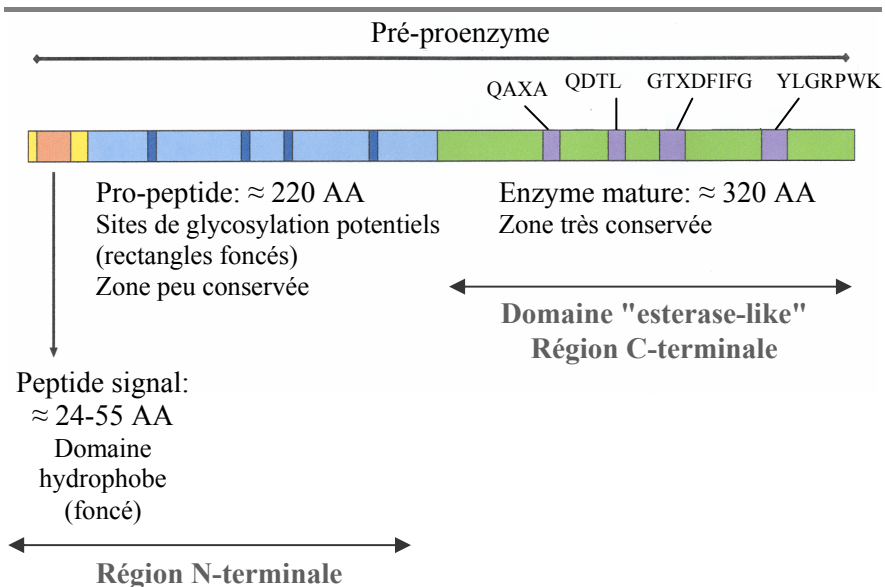


Dans ce chapitre, nous nous focaliserons sur la structure, la localisation et les propriétés des PME.

## ■ Structure de la protéine

### Pré-pro-enzymes

Les gènes de PME encodent des **pré-pro-protéines** présentant des motifs peptidiques considérés comme étant la signature des PME (figure 13). La pré-région, ou peptide signal, est nécessaire à l'adressage de la protéine vers le réticulum endoplasmique. La pro-PME est sécrétée vers l'apoplasme *via* l'appareil de golgi et, généralement, seule la partie mature de la protéine (sans la pro-région) est présente dans la paroi (Micheli, 2001). D'après Al-Qsous *et al.* (2004), les précurseurs sont rarement identifiés sous leur forme protéique, probablement en raison de leur très faible quantité dans les extraits, mais peuvent quand même être présents dans la paroi.



**Figure 13** : schéma de la structure générale des PME – les régions en mauve correspondent aux acides aminés très conservés au cours de l'évolution et considérés comme étant les principales signatures des PME. Le nombre d'acides aminés composant chacune des régions est approximatif et déterminé d'après les tailles les plus couramment observées dans les PME végétales.

L'identité de la séquence N-terminale entre différentes isoformes est en général très faible, excédant rarement les 20 %. Par contre, les structures primaires des PME de plantes supérieures sont plus homologues dans la région C-terminale. Cette région correspond à un domaine, nommé le **domaine « esterase-like »**, qui confère la fonction PME aux protéines. En outre, la séquence possède des sites de glycosylation potentiels, principalement dans la région N-terminale du polypeptide (Richard *et al*, 1994).

Les PME extraites de la paroi n'ayant généralement pas de pro-région, un clivage de cette dernière doit avoir lieu soit au moment de la sécrétion de la PME mature dans l'apoplasme, soit avant, soit après. Dans le premier cas, la pro-région pourrait être dégradée, ou jouer un rôle à l'intérieur de la cellule, ou encore dans l'apoplasme.

#### - **Rôle de la pro-région**

- ▶ Le rôle de la pro-région reste hypothétique. Elle pourrait intervenir :
  - dans la fonction biologique des PME.
  - dans l'adressage des PME vers la paroi.
  - comme chaperonne intramoléculaire, permettant le repliement conformationnel correct de la protéine mature.
  - en tant qu'inhibiteur de l'activité enzymatique de la PME mature.
- ▶ Certains arguments vont en faveur du rôle hypothétique de la pro-région en tant qu'inhibiteur de la partie mature de la protéine et de son repliement.

Elle pourrait inhiber la partie mature de la protéine lors de sa sécrétion vers l'apoplasme afin d'empêcher la désestérification des pectines avant leur insertion dans la paroi.

En effet, nous verrons plus loin que les gènes de PME sont de deux types différents<sup>8</sup>. Ceux du type II ne possèdent pas (ou presque pas) de pro-région. La comparaison des modes d'action

---

<sup>8</sup> Voir p 43 – « Les PME, une famille multigénique... ».

des PME actives dans le pollen, la croissance du tube pollinique et les bactéries phytopathogènes lors de l'infection de la plante, indique que toutes ces PME sont impliquées dans la macération de la paroi<sup>9</sup>, et appartiennent au type II. Ce mode d'action pourrait donc caractériser les PME qui n'ont pas de pro-région. De plus, cette hypothèse est en accord avec le fait que l'inhibition de l'activité PME n'est pas nécessaire lors de l'excrétion de la protéine par les bactéries, puisqu'elles ne sécrètent pas de pectine (Micheli, 2001).

- La protéine précurseur pourrait être (temporairement) intégrée dans la membrane plasmique, après quoi la partie mature de la protéine serait transportée vers la paroi.

Ebbelaar *et al.* (1996) ont identifié un fragment transmembranaire probable, constitué de 23 résidus, dans la pro-région de la PE3M du haricot vert (*Phaseolus vulgaris* cv. Masai).

Dans les tubes polliniques, la présence de PME à l'intérieur des vésicules sécrétoires transportant des pectines estérifiées pourrait être la première preuve immunocytochimique soutenant l'hypothèse du transfert des PME sous forme de précurseur inactif (Li *et al.*, 2002). Ces dernières peuvent ensuite être activées à la pointe du tube pollinique où l'exocytose a lieu. De plus, l'association des PME à ces structures membranaires est en accord avec la découverte d'un domaine transmembranaire hydrophobe au niveau de l'extension N-terminale de la PME de *Phaseolus vulgaris* (Ebbelaar *et al.*, 1996).

- Toutefois, le fait que des isoformes identifiées comme étant des précurseurs soient actives relance le débat sur le rôle de la pro-région en tant qu'inhibiteur de la partie mature des PME.

Al-Qsous *et al.* (2004) ont identifié plusieurs isoformes de PME actives dans des plantules de lin, grâce à un polysérum dirigé contre la partie protéique des PME (région N-terminale du

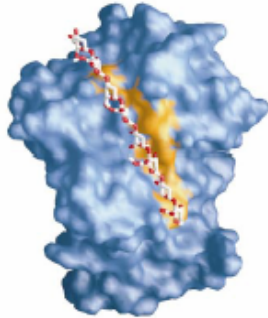
<sup>9</sup> Lorsque les PME agissent au hasard sur les HGs (Multiple Attack Mechanism – MAM), la déméthylestérification libère des protons qui stimulent l'action des endopolygalacturonases et contribue au ramollissement de la paroi.

domaine conservé « esterase-like »). Ces isoformes diffèrent non seulement par leur pI mais également par leur poids moléculaire : deux isoformes neutres (N1-N2) et une modérément basique (B1) de 50-60 kDa, ainsi qu'une isoforme très basique (B2) de 37 kDa. Les auteurs affirment que l'isoforme B2 pourrait être la forme mature, alors que les isoformes N1-N2 et B1 pourraient être les pro-protéines et pré-pro-protéines, respectivement.

## Structure tridimensionnelle de la protéine mature

---

Les PME appartiennent à la famille des protéines à  $\beta$ -hélices parallèles. Johansson *et al.* (2002) ont publié la **structure tridimensionnelle** d'une PME végétale, provenant de racines de carottes (*Daucus carota*). La structure détaillée est disponible sur le site internet ProSite (<http://au.expasy.org/prosite/>).



---

**Figure 14 :** structure d'une PME de carotte - représentation de la surface du sillon de liaison à la pectine. Les résidus aromatiques (oranges) bordent le sillon. (Repris de Johansson *et al.*, 2002).

Brièvement, l'organisation en  $\beta$ -prisme consiste en trois feuillets  $\beta$  parallèles et les tours entre les rangs ont une structure en  $\beta$ -hélice régulière. La protéine présente une longue crevasse peu profonde qui possède toutes les propriétés attendues pour le **site de liaison à la pectine** (Fig. 14). La partie centrale de cette crevasse est bordée par plusieurs résidus aromatiques, caractéristiques des sites de liaison d'hydrates de carbone. Le **site actif** de la PME de carotte est également localisé dans

cette crevasse avec deux résidus carboxylate au centre, Asp136 et Asp157.

La structure générale de la PME de carotte et celle d'*Erwinia chrysanthemi* - la seule autre PME dont la structure tridimensionnelle a été déterminée - sont très similaires. De plus, la similarité de séquence parmi les PME végétales est élevée (Fig. 15) et les résidus du site actif sont conservés. Il y a seulement de petites différences dans la longueur des chaînes des enzymes végétales. La structure de la PME de carotte décrite ici peut donc être considérée comme représentative de toutes les PME végétales.

## ■ Les PME, une famille multigénique...

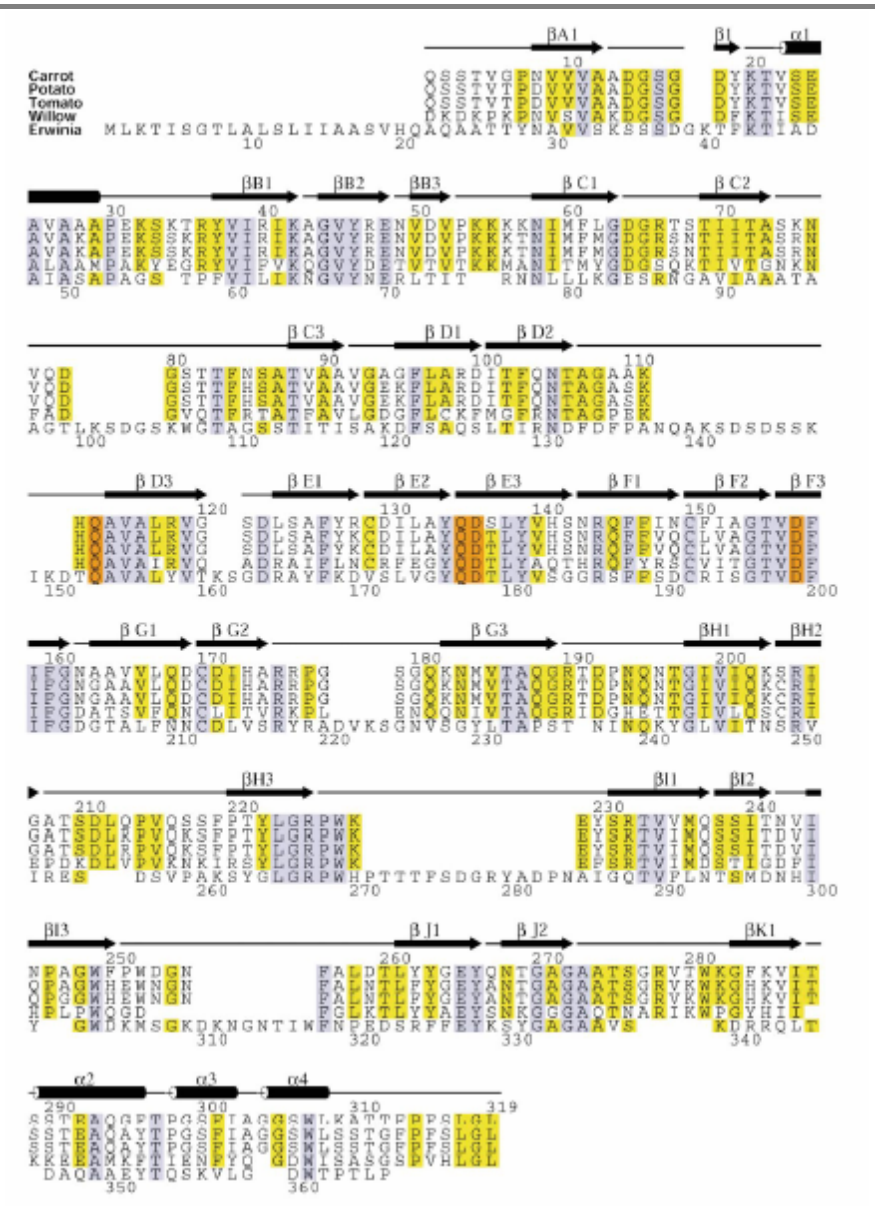
D'après les données récentes provenant du séquençage systématique du génome d'*Arabidopsis*, **les gènes de PME sont de deux types** (Micheli, 2001):

- **Type I** : les gènes de cette classe contiennent seulement deux ou trois introns et une longue pro-région.
- **Type II** : les gènes de cette seconde classe contiennent cinq ou six introns et éventuellement une courte pro-région. Ces séquences ont une structure proche de celle des PME identifiées chez les organismes phytopathogènes (bactéries et champignons) et sont impliqués dans la macération de la paroi lors de l'infection de la plante.

---

La présence de divers types de PME reflète la diversité que l'on peut trouver dans l'organisation structurale des gènes « PME-like » des plantes supérieures.

---



**Figure 15 :** alignement structural de la séquence de quatre PME végétales et d'une PME bactérienne – domaine « esterase-like ». Les résidus conservés dans toutes les séquences sont colorés en bleu, alors que ceux conservés uniquement dans quatre des cinq séquences sont colorés en jaune. Les identités de séquence entre la PME de carotte (SwissProt Accession N° P83218 – Marković et al., 2002), d'une part, et les séquences de PME de pomme de terre (EMBL : AF152172), feuilles de tomates (GenBank : U49330), saule (EMBL : AB029461) et *E. chrysanthemi* (GenBank : Y00549), d'autre part, sont de 87 %, 85 %, 52 % et 31 %, respectivement. Les résidus proposés comme faisant partie du site actif sont tous conservés et indiqués en orange. (Repris de Johansson, 2002).

De plus, plusieurs isoformes de PME détectées dans les parois sont encodées par une **famille multigénique** et récemment, le séquençage systématique du génome d'*Arabidopsis* a fortement contribué à l'identification de 79 gènes montrant de fortes homologues avec des pectine estérases chez cette espèce (« The *Arabidopsis* Genome Initiative », 2000). Un grand nombre d'ADN-c ont été isolés chez la tomate (Gaffé *et al.*, 1994, 1997), le haricot (Ebbelhaar *et al.*, 1996) et *Arabidopsis* (Richard *et al.*, 1994 ; Micheli *et al.*, 1998, 2000). Certains sont exprimés de façon ubiquiste et pourraient être impliqués dans la maintenance de l'intégrité de la paroi à travers toute la plante (« housekeeping genes »). D'autres semblent spécifiques des organes ou sont exprimés à des moments bien particuliers au cours du développement. Enfin, il existe également des gènes inactifs pouvant correspondre à des pseudogènes.

Nous avons vu ci-dessus que la partie N-terminale des PME est peu conservée. Toutefois, la séquence « N-leader » de la PME1 d'*Arabidopsis thaliana* apporte une première exception à cette règle puisqu'elle présente 47 % et 51 % d'identité avec les séquences du précurseur PVRNAPE (Recourt *et al.*, 1992) et de la PE3M (Ebbelaar *et al.*, 1996) du haricot vert (*Phaseolus vulgaris*), respectivement. De plus, la PE3M et AtPME1 sont toutes deux exprimées dans divers tissus en développement et certains sites de N-glycosylation sont conservés entre PVRNAPE et AtPME1. Ces caractéristiques indiquent que les séquences N-terminales de certains précurseurs de PME sont très probablement conservées au cours de l'évolution.

---

Les mécanismes de sécrétion<sup>10</sup> semblent donc conservés, probablement en raison de leur importance pour la spécification du rôle biologique de la protéine.

---

Enfin, il semble que chez les plantes supérieures, les isoformes d'une même espèce sont phylogénétiquement moins reliées les unes aux autres

---

<sup>10</sup> Les mécanismes de sécrétion sont en effet déterminés par la séquence N-terminale.

qu'à certaines isoformes d'autres espèces. L'établissement d'un arbre phylogénétique permet de distinguer différents groupes, probablement définis en raison de possibles relations fonctionnelles entre les protéines plutôt qu'en raison des relations taxonomiques entre les espèces.

---

Les PME des plantes supérieures peuvent donc être distribuées en différents groupes fonctionnels.

---

Ceci est bien illustré par la comparaison des séquences spécifiquement exprimées dans le pollen en développement. Ainsi, le gène Bp19, qui est exprimé dans les spores aux stades précoces de développement (Albani *et al.*, 1991 ; Kim *et al.*, 1997) présente moins de similarités avec PPE1 (Mu *et al.*, 1994) et ZmC5 (Wakeley *et al.*, 1998), spécifiquement exprimés dans les étapes tardives de développement du pollen, que ces deux gènes entre eux.

## ■ Propriétés des PME

### Physico-chimiques

---

Les multiples **isoformes de PME** diffèrent par leur point isoélectrique (pI) et/ou par leur masse moléculaire et leurs propriétés catalytiques. De plus, les proportions relatives de ces isoformes peuvent varier fortement suivant le stade de développement et l'organe considérés (Bordenave, 1996).

Historiquement, les premières analyses de PME ont été réalisées sur des isoformes purifiées à partir de parois végétales. La plupart de ces isoformes présentent des **pI neutres** ou **alcalins**, et rarement des **pI acides**. Toutefois, de récentes études ont montré l'importance des PME acides dans la physiologie végétale. En raison du fait que ces isoformes sont probablement faiblement liées aux composants de la paroi<sup>11</sup>, des procédures d'extraction des protéines solubles augmentent très fortement

---

<sup>11</sup> Comme les isoformes ayant un pI acide sont chargées négativement aux pH physiologiques (si pI < pH), des répulsions électrostatiques les empêchent de se lier aux groupements carboxyliques libres des pectines.



leur récupération. Le peu d'isoformes acides détectées chez les plantes supérieures pourrait donc être lié aux procédures expérimentales utilisées pour l'extraction (Micheli, 2001).

La masse moléculaire des PME végétales va généralement de 21 à 53 kDa (Bordenave, 1996), mais certaines sont beaucoup plus petites, comme l'isoforme de 15 kDa dont l'activité est détectée dans le cambium du peuplier tremble (Micheli *et al.*, 2000), ou beaucoup plus grandes, comme les isoformes de 91 kDa et 100-120 kDa, détectées dans les racines de chicorée (Thonar *et al.*, sous presse) et les tissus en maturation du lin (Al-Qsous *et al.*, 2004), respectivement. Toutefois, les isoformes de 100-120 kDa chez le lin semblent être présentes sous forme de dimères, la taille du monomère ne dépassant pas les 50-60 kDa.

Comme beaucoup d'autres protéines pariétales, les PME peuvent être glycosylées. Ces modifications post-traductionnelles pourraient augmenter la stabilité de la protéine (Bordenave, 1996).

## Enzymatiques

### ● Mode d'action

Nous avons vu dans le chapitre précédent qu'après leur intégration dans la paroi, les PME matures peuvent présenter divers modes d'action. Elles peuvent agir sur les homogalacturonanes soit au hasard, soit linéairement le long des chaînes pectiques. Lorsque les PME agissent **au hasard** (**Multiple Attack Mecanism – MAM**), la déméthylestérification libère des protons qui stimulent l'action des endopolygalacturonases et contribue au ramollissement de la paroi. Lorsque les PME agissent **de façon linéaire** (**Single-Chain Mecanism – SCM**), elles donnent naissance à des blocs d'acides carboxyliques pouvant interagir avec les ions  $\text{Ca}^{2+}$ , et ainsi créer des gels pectiques. L'action des endopolygalacturonases sur de tels gels étant limitée, ce pattern d'action contribue à l'épaississement de la paroi (Micheli, 2001).

Ces deux mécanismes nécessitent la présence d'un groupe carboxylique libre, localisé à la seconde position voisine la plus proche (**contrainte UXE**) (Goldberg *et al.*, 2001). Dès lors, les PME végétales sont beaucoup moins actives sur des pectines fortement méthylestérifiées que sur des pectines présentant un DE de 20 à 30 %. La désestérification des pectines n'est, en outre, jamais complète (DE final de 11 % chez l'orange et la tomate) (Bordenave *et al.*, 1996).

Il semble que la plupart des **PME végétales** désestérifient la pectine de façon linéaire (Bordenave, 1996), mais de récents travaux ont démontré que certaines sont capables de désestérifier au hasard *in planta* (Willats *et al.*, 2001 b). Ces isoformes pourraient faire partie des processus où une digestion partielle de la paroi est nécessaire.

Enfin, l'immobilisation des PME augmente fortement leur activité envers un substrat exogène, et à l'inverse, leur solubilisation résulte souvent en une perte de l'activité. Il semble donc que la fixation des PME à la paroi induit des caractéristiques conformationnelles importantes pour leur activité (Bordenave, 1996).

## ● Régulation de l'activité PME

Nous avons vu plus haut que la régulation de l'activité des PME végétales est notamment obtenue par l'expression différentielle d'un grand nombre d'isoformes dans divers tissus et lors de diverses étapes du développement. Cependant, l'activité des PME peut aussi être régulée par des « hormones » comme l'auxine, l'acide abscissique (ABA) ou l'acide gibbérellique (GA<sub>3</sub>) (Bryan & Newcomb, 1954 ; Micheli, 2001). De plus, l'expression de certains gènes de PME est sensible à la lumière (Alexandre *et al.*, 1997 ; Roger *et al.*, 2001).

En raison du fait que l'on pensait que les PME acides étaient principalement confinées aux champignons<sup>12</sup>, qui désestérifient la pectine au hasard, l'hypothèse la plus simple était que ce type de désestérification dépendait des PME acides. Alors que la

---

<sup>12</sup> Voir p 32 – « Rôle des PME – le cas des zones de jonction intercellulaires ».

déséstérification linéaire dépendait des PME basiques. Toutefois, de récentes études ont montré que le type d'activité PME dépend aussi du pH ou du degré initial de méthylestérification des pectines. De plus, l'activité PME est modulée par la présence de cations.

Le pattern d'action des PME matures est donc régulé dans la paroi par de nombreux facteurs qui révèlent la complexité de ces enzymes et amènent le débat sur l'hypothèse la plus simple qui divise les PME en deux groupes : « alcalines – déséstérification linéaire » et « acides – déséstérification au hasard » (Micheli, 2001).

### □ Influence du pH

Les PME végétales présentent un optimum de pH entre 6 et 8. Ce comportement pourrait être dû à de fortes interactions, aux pH acides, entre l'enzyme chargée positivement<sup>13</sup> et les groupements carboxyliques libres des acides polygalacturoniques, produits de la réaction enzymatique. Aux pH basiques - auxquels les PME végétales sont neutres ou chargées négativement en raison de leurs pI basiques - les enzymes pourraient être libérées de leur substrat par l'intermédiaire de répulsions électrostatiques entre les groupements carboxyliques libres et l'enzyme chargée négativement. De plus, au-delà d'un pH de 7, les pectines subissent une auto-déséstérification, qui en retour augmente l'activité PME qui a besoin de groupes carboxyliques libres pour fonctionner.

La solubilisation des PME peut également modifier leur optimum de pH (Bordenave, 1996).

Enfin, les isoformes PE $\alpha$  et PE $\gamma$  de *Vigna radiata* (Bordenave *et al.*, 1996) déséstérifient la pectine de DE 74 % de façon différente en fonction du pH (Catoire *et al.*, 1998 – Repris de Goldberg *et al.*, 2001). Ainsi, à pH 5,6, la déséstérification se fait selon le mécanisme «SCM – en blocs », alors qu'à pH 7,6, le mécanisme impliqué est le

<sup>13</sup> Si pI > pH : Protéine cationique (chargée positivement)  
Si pI < pH : Protéine anionique (chargée négativement)

« MAM – au hasard ». Le processus de désestérification dépend donc du pH et la désestérification se fait préférentiellement « en bloc » à un pH plus faible.

#### □ **Influence des cations**

Chez les PME végétales, les cations semblent essentiels à l'activité enzymatique. Avec le NaCl, l'optimum de concentration est d'environ 0,2 M. La nature de l'anion pourrait aussi intervenir dans cette stimulation. A de faibles concentrations (5-25 mM), le calcium augmente fortement l'activité PME, tandis qu'à de plus fortes concentrations, peut-être en raison de la formation de gels de pectates, il diminue la vitesse de réaction. Les cations monovalents ou divalents, en fonction de leur concentration, pourraient aussi modifier l'affinité de l'enzyme pour son substrat (Bordenave, 1996). En outre, les cations trivalents semblent plus actifs que les bivalents, qui sont eux-mêmes plus actifs que les cations monovalent dans l'augmentation de l'activité enzymatique (Micheli, 2001).

La PME n'est pas intrinsèquement activée par les ions métalliques, mais ces ions tendent à dissocier les molécules d'enzymes des blocs d'acides carboxyliques de la paroi. En effet, les PME végétales ayant généralement des pI basiques, elles sont cationiques même à des pH légèrement basiques. Toutefois, ceci n'est probablement pas le seul mécanisme d'activation puisque certaines PME végétales acides sont aussi activées par les cations.

En outre, si les groupements carboxyliques libres nécessaires à l'activité enzymatique sont bloqués par des ions métalliques, la réaction enzymatique n'a pas lieu, ce qui expliquerait que les PME sont inhibées par de fortes concentrations en sels.

---

La présence de cations module à la fois la quantité d'enzymes disponibles pour la réaction de déméthylation et la conformation de la pectine, et, en réponse, l'affinité des PME pour leur substrat.

---

Considérant la grande flexibilité des molécules de pectine, il est probable que la proximité non seulement d'ions, mais aussi de solvants et d'autres macromolécules puissent induire des changements conformationnels. *In muro*, la composition ionique du microenvironnement pourrait donc contrôler le taux de réaction.

En outre, d'après Ren & Kermode (2000), la façon dont les pectines pariétales réagissent après leur désestérification par les PME ne semble pas être déterminée par les PME elles-mêmes mais plutôt par le micro-environnement présent autour des pectines pariétales.

### □ Inhibiteurs de l'activité PME

En plus d'un rôle possible de la pro-région en tant qu'inhibiteur de l'activité PME lors de la voie de sécrétion, et de la régulation de la déméthylestérification des pectines pariétale, il a été montré qu'il existe des inhibiteurs de l'activité PME dans la paroi.

Giovane *et al.* (1995) ont trouvé un **inhibiteur protéique** des PME chez le kiwi. Cet inhibiteur est spécifiquement actif contre les PME végétales. La méthode d'inhibition passe par la formation d'un complexe ionique (1:1) de forte affinité entre l'enzyme et la glycoprotéine. La séquence de cet inhibiteur présente des similarités avec la partie N-terminale des pro-PME végétales (Giovane *et al.*, 2004). De plus, la présence dans le génome d'*Arabidopsis* d'au moins deux séquences fortement similaires à cet inhibiteur suggère que ce dernier est ubiquiste chez les plantes (Wolf *et al.*, 2003 ; Raiola *et al.*, 2001).

McMillan & Pérombelon (1995) ont eux aussi trouvé un inhibiteur de l'activité PME associé ioniquement aux enzymes cellulaires mais pas à celles de la paroi, dans des tubercules de pomme de terre. Cet inhibiteur, non compétitif (contrairement à la glycoprotéine inhibitrice du kiwi) est un **acide uronique** (200 kDa) méthylestérifié à 20 % comportant un grand nombre de ramifications de sucres neutres.

En outre, Goldberg *et al.* (2001) ont montré que la distribution des unités carboxyliques le long du squelette pectique contrôle l'activité des PME pariétales (isoformes de PME  $\alpha$  et  $\gamma$ , de l'hypocotyle de haricot - *Vigna radiata*) de façon plus importante que le degré de méthylestérification, une distribution « au hasard » conduisant à la plus forte activité. Il a également été montré que l'acide polygalacturonique est un inhibiteur compétitif de l'activité de l'isoforme  $\alpha$  à pH 5,6, ainsi que de l'isoforme  $\gamma$  à pH 5,6 et 7,6.

Dans ces conditions de pH, la chute de l'activité enzymatique est corrélée à la formation d'un gel pectique par association avec des ions  $\text{Ca}^{2+}$ . Toutefois, même en absence d'inhibition par le produit de la réaction, l'activité chute à des niveaux négligeables bien avant que le substrat ne soit totalement désestérifié. La fin de la réaction peut être due au manque de résidus hydrophobes, pouvant être nécessaires à la liaison de l'enzyme sur son substrat ou à la diminution des interactions solvant/substrat. Le contrôle de « **feedback** » de la déméthylestérification pourrait représenter une sorte de protection contre la désestérification totale des HGs, pouvant perturber le trafic apoplastique.

## ■ Localisation des PME et de leur activité

Très peu d'expériences d'immunolocalisation ont été effectuées (Christensen *et al.*, 1998 ; Mareck *et al.*, 1995 ; Quentin *et al.*, 1997 ; Li *et al.*, 2002 ; Guglielmino *et al.*, 1997a ; Chen *et al.*, 2000 ; Ebbelhaar *et al.*, 1996). Ces études ont utilisé cinq polysérums au total, produits contre des isoformes de PME purifiées des tissus de fruits (Harriman, 1990 - tomate ; Christensen *et al.*, 1998 - orange), de tissus végétatifs (Mareck *et al.*, 1995 - lin ; Chen *et al.*, 2000 - tabac) ou encore de suspensions cellulaires (Goldberg *et al.*, 1992 - soja).

Ces sérums ont en général été très peu caractérisés et sont tous dirigés contre des PME glycosylées, sauf celui dirigé contre des isoformes d'oranges non glycosylées (Christensen *et al.*, 1998). Il est donc difficile

de déterminer si l'épitope reconnu est de nature protéique ou polysaccharidique, ce qui peut influencer la spécificité.

#### ○ Niveau cellulaire

Les expériences d'immunolocalisation indiquent toutefois que les PME sont présentes principalement dans la lamelle mitoyenne et les jonctions intercellulaires, en association avec les pectines acides (Ebbelhaar *et al.*, 1996 ; Quentin *et al.*, 1997). Des méthodes cytochimiques ont en effet montré que ces parties de la paroi végétale sont très riches en pectines acides, alors que les pectines méthylestérifiées semblent être distribuées à travers toute la paroi.

Signalons également que des PME ont été observées en association avec les plasmodesmes (Chen *et al.*, 2000).

---

La localisation différentielle des PME et de leur substrat pourrait expliquer pourquoi les parois végétales peuvent contenir de grandes quantités de pectines méthylestérifiées, en même temps qu'une quantité théorique suffisante d'enzymes pour déméthyliser ces pectines entièrement (Bordenave, 1996).

---

#### ○ Niveau tissulaire

Cependant, les travaux de Mareck *et al.* (1995) chez le lin ont montré que les PME sont présentes dans toutes les parties de l'hypocotyle, mais le marquage n'est pas homogène et semble renforcé dans la zone apicale<sup>14</sup>. Dans la partie basale, l'épiderme est plus contrasté que les tissus internes.

De plus, Alexandre *et al.* (1997) ont observé, dans des plantules de lin cultivées à l'obscurité, que **les niveaux d'activité PME sont proportionnels à la quantité de pectine méthylée** qui prédomine dans les cellules en élongation ou non.

---

<sup>14</sup> Cette observation est en accord avec le rôle potentiel des PME concernant la déméthylation progressive des pectines déposées dans les parties les plus jeunes de la plantule.

Ces PME peuvent toutefois être inactives *in muro* mais prêtes à rapidement catalyser la déméthylestérification des pectines si nécessaire. Ces enzymes présentes dans la paroi devraient être considérées comme constitutives plutôt qu'actives, et, tout comme les pectines méthylées, sont des marqueurs de l'élongation.

---

En fait, la plupart des PME sont fortement liées à la paroi : elles sont donc probablement incapables de déméthyliser les pectines fortement estérifiées qui sont hors d'atteintes, à moins qu'un environnement ionique favorable leur permette de se déplacer vers d'autres parties de la paroi. Dans l'hypocotyle de haricot (*Vigna radiata*), où plusieurs isoformes ont été identifiées et purifiées, la force de fixation varie fortement d'une isoforme à l'autre (Bordenave, 1996).

Les isoformes les plus faiblement liées pourraient être les plus actives *in vivo*. La plante pourrait donc réguler l'activité PME par le contrôle des concentrations ioniques à l'intérieur de la paroi. On peut imaginer qu'au niveau de la paroi, des micro-domaines où la concentration ionique est adéquate pour la libération de l'enzyme et la réaction, pourraient coexister avec des domaines où les PME sont retenues et ne peuvent fonctionner (Bordenave, 1996). Les résultats de Quentin *et al.* (1997) chez le lin vont également dans ce sens.

---

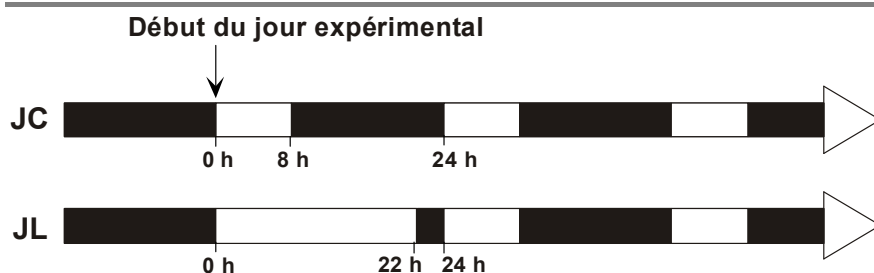


## Présentation du système expérimental: la plante modèle de floraison - *Sinapis alba*

---

*Sinapis alba*, la moutarde blanche est une espèce caulescente de jours longs (JL) préférante (Bernier, 1969) de la famille des Brassicaceae, à laquelle appartient également *Arabidopsis*. Cependant, cultivées en chambres phytotroniques en jours courts (JC) de 8 heures, à 20 °C constants, sous une intensité lumineuse et avec un apport en azote adéquats, les plantes peuvent être maintenues à l'état végétatif pendant plusieurs mois. Seule une fraction minoritaire des plantes passe à fleurs lentement et une à une après le troisième mois de culture en JC.

La transition florale des méristèmes est généralement étudiée sur les espèces photopériodiques réagissant à un cycle inducteur car ce sont les seules chez qui la transition florale s'opère de façon suffisamment synchrone parmi les individus d'une population (Bernier, 1989). Après deux mois de culture, les plantes de *Sinapis* peuvent être induites à fleurir suite à l'application d'un seul jour long de minimum 10 heures (22 h dans nos expériences). Tous les individus ainsi traités passent à fleurs. La figure 16 donne une représentation schématique des JC et JL.

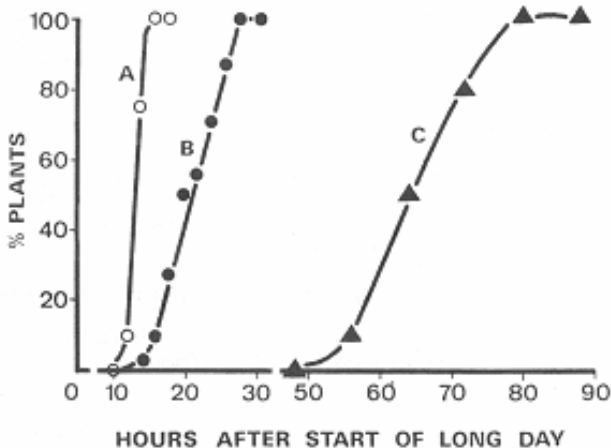


**Figure 16 :** comparaison schématique des jours courts (JC – maintient en conditions végétatives) et jour long (JL – inducteur de floraison).

La modification de la photopériode est perçue par les feuilles adultes (Havelange & Bernier, 1991) qui, en réponse, déclenchent l'exportation d'un signal de floraison - nommé stimulus floral - transitant avec les assimilats photosynthétiques de la sève phloémienne vers le méristème apical de tige (SAM: shoot apical meristem) (Lang, 1965; Bernier *et al.*,

1981a). Ce transport est probablement très rapide car la vitesse de déplacement de la sève phloémienne est de plusieurs dizaines de centimètres à l'heure (Salisbury & Ross, 1992). Or, à l'âge de deux mois, la portion de tige comprise entre les plus jeunes feuilles adultes et le SAM n'est que de quelques centimètres (les plantes ont environ 25 cm de haut et portent une quinzaine de feuilles visibles). Grâce à des défoliations séquentielles, le moment d'exportation du stimulus floral - ou de son composant le plus tardif - a pu être situé entre la 16<sup>ème</sup> et la 28<sup>ème</sup> heure après le début du JL.

La figure 17 (courbe A) nous montre que pour l'induction florale, les plantes les plus précoces n'ont que 6 heures d'avance sur les plus tardives. Pour la translocation du stimulus floral (courbe B) et l'initiation de la première fleur (courbe C) cette fourchette augmente de 12 à 24 heures, respectivement, indiquant que la synchronisation causée par le JL est progressivement perdue avec le temps (Bernier, 1989).



**Figure 17 :** trois étapes de la transition florale induite par un JL chez *Sinapis alba*. A, étape d'induction : la courbe A est obtenue en soumettant des lots de plantes cultivées 60 jours en JC à un JL de durée croissante (de 10 à 18 heures). B, étape d'export hors des feuilles du stimulus floral : la courbe B est obtenue en défoliant les plantes après des temps croissants suivant le début d'un JL inducteur de 22 heures et en déterminant, par dissection, le pourcentage de plantes ayant initié des boutons floraux. C, étape de morphogenèse : la courbe C est obtenue en déterminant, sur section, le moment d'initiation du premier méristème floral par le méristème inflorescentiel chez des plantes ayant reçu un JL de 22 heures. (D'après Bernier, 1989).

## ■ Paramètres de croissance du méristème apical

Le SAM végétatif de *Sinapis* a la forme d'un dôme d'environ 100 µm de large et 20 µm de haut (Bernier *et al.*, 1967). Il est composé de quelques milliers de cellules et a un poids sec de 200 à 300 ng (Bernier, communication personnelle).

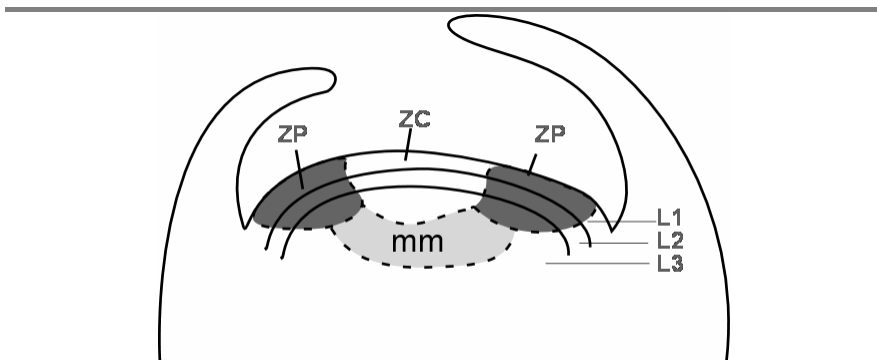
Comme toutes les dicotylédones et certaines monocotylédones, le SAM de *Sinapis* peut être décomposé en une **tunica superficielle bisériée**, c'est-à-dire composée de deux assises cellulaires superficielles (L1 et L2), et d'un **corpus sous-jacent** (L3) (Lyndon, 1998). Les cellules de la tunica se divisent de façon anticline (perpendiculairement à la surface du méristème), sauf les cellules de L2 - appartenant en même temps à la zone périphérique (ZP) et impliquées dans l'organogenèse - qui se divisent également de façon péricline (parallèlement à la surface de l'apex). La tunica est ainsi responsable de la croissance en surface du méristème. Les cellules du corpus, quant à elles, se divisent dans tous les plans et sont responsables de la croissance en volume du méristème apical.

Chez la plupart des SAM, une **zonation cytohistologique** est superposée à cette zonation par couches cellulaires : les cellules de la zone centrale (ZC) (englobant la tunica et le corpus), sont plus grandes, se divisent moins fréquemment et possèdent moins d'ARN et de protéines que les cellules de la zone périphérique (ZP - de forme annulaire) de ces mêmes tissus (Steeves & Sussex, 1989; Lyndon, 1998).

Sous la ZC, une troisième zone est visible dans le SAM végétatif. Elle est composée de cellules aplaties qui se divisent exclusivement dans le sens transversal. On la nomme méristème médullaire car elle est à l'origine de la moëlle centrale de la tige. Dans la plupart des SAM, la ZC n'a jamais d'activité organogène, ce qui se traduit par la croissance indéfinie de l'axe issu de ces SAM. La figure 18 présente la structure générale du SAM.

Les productions latérales du SAM, que ce soit les feuilles en phase végétative ou les méristèmes floraux en phase reproductive, sont initiées

à partir de la ZP, en général suite à l'apparition locale de divisions périclines en L2 ou L3. Le SAM initie des feuilles selon une phyllotaxie spiralee au rythme d'une feuille en moyenne tous les 2,8 jours (Bernier, 1997).



**Figure 18 :** représentation schématique d'un SAM (modifié d'après Ding et al., 1999). L1 et L2, les deux assises cellulaires superficielles formant la tunica ; L3, corpus. mm, méristème médullaire ; ZC, zone centrale ; ZP, zone périphérique.

Suite à l'arrivée du stimulus floral, le SAM termine rapidement (avant la 40<sup>ème</sup> heure) l'initiation d'une ou deux dernières feuilles et est le siège de multiples changements spectaculaires. Ses activités de morphogénèse cessent après un jour environ et reprennent aux alentours de la 60<sup>ème</sup> heure après le début du JL par l'initiation des primordiums floraux. Il n'y a pas d'appendice intermédiaire formé entre la dernière feuille et la première fleur (Bernier, 1989).

Les changements de croissance concernent tous les composants de l'apex, incluant le dôme méristématique, les primordiums de feuilles, les entrenoeuds les plus apicaux et les méristèmes axillaires, et chaque changement prend place à un moment bien particulier de la transition florale.

Le changement le plus précoce est une augmentation de l'activité organogénétique. Dès la 24<sup>ème</sup> h après le début du JL, le rythme d'initiation des dernières feuilles s'accélère et passe finalement à un méristème floral toutes les 8,4 heures une fois le stade reproducteur atteint (Bernier, 1997).

Ces changements précoces sont probablement liés à une augmentation de l'index mitotique.

Un jour plus tard, à la 48<sup>ème</sup> heure, le volume du SAM s'accroît. Et à partir de la 72<sup>ème</sup> heure, le rapport hauteur/diamètre augmente (Bernier, 1997) : le SAM devient donc plus gros et plus bombé.

Tout comme la disposition des feuilles le long de la tige végétative est spiralée, celle des fleurs reste spiralée. Cependant, la phyllotaxie devient plus complexe lors du passage à la formation des fleurs (Bernier, 1997).

## ■ Transformations au sein du SAM au cours de la transition florale

Au cours de la transition florale, le SAM de *Sinapis* subit de nombreuses modifications. Celles-ci concernent notamment le métabolisme énergétique (Bodson & Outlaw, 1985 ; Bodson & Remacle, 1987 ; Lejeune *et al.*, 1993 ; Bernier, 1989 ; Havelange & Bernier, 1974 ; Jacqumard, 1978), l'expression génique (Cremer *et al.*, 1992 ; Melzer *et al.*, 1995 ; Menzel *et al.*, 1996 ; Bonhomme *et al.*, 1997 ; Bonhomme *et al.*, 2000), la prolifération cellulaire, et les communications symplasmiques. Ces deux derniers paramètres, pouvant apporter des éclaircissements à nos résultats sont discutés ci-dessous.

### Prolifération cellulaire

Dans la zone centrale comme dans les zones périphériques du méristème végétatif, on distingue une population de cellules dites cyclantes (30 % environ de la population) dont la durée du cycle cellulaire est de 66 heures (Jacqumard *et al.*, 1998) et une population non-cyclante (70 % des cellules) dont le cycle de division est très long (plus de 10 jours) (Gonthier *et al.*, 1985). En outre, la fraction de cellules cyclantes est toujours supérieure dans la zone périphérique (Gonthier *et al.*, 1987).

L'induction florale provoque de nombreux changements de la prolifération cellulaire affectant l'ensemble du SAM (Bernier *et al.*, 1981a ; Jacqumard *et al.*, 1998). L'index mitotique augmente dès la 16<sup>ème</sup>

heure après le début du JL et on assiste à une première vague de mitoses aux alentours des 24 et 28<sup>ème</sup> heures. Ce premier pic de mitoses provient à la fois du déblocage de cellules non-cyclantes en phase G2 (post-synthèse de l'ADN) du cycle cellulaire et du raccourcissement de la phase G2 des cellules cyclantes. Après ce pic, une part importante de la population cellulaire cyclante (représentant maintenant 52 % de la population cellulaire totale) se trouve synchronisée en phase G1 (pré-synthèse de l'ADN).

Ces cellules vont ensuite parcourir le cycle cellulaire de façon accélérée – la durée du cycle de division des cellules cyclantes est passée de 66 à 32 heures, en raison d'une réduction de la durée de toutes les phases du cycle cellulaire. La phase S passe de 15 à 7 heures essentiellement grâce à une réduction de moitié de la taille des réplicons (unités de réplication de l'ADN). On obtient ainsi un pic de cellules en phase S de réplication de l'ADN à la 36<sup>ème</sup> heure et un nouveau pic de mitoses à la 60<sup>ème</sup> heure (au moment où commence l'initiation des premiers méristèmes floraux).

Une partie de ces changements est causée par une arrivée accrue de cytokinines en provenance des feuilles (Bernier, 1989).

## Fréquence des plasmodesmes et communications symplasmiques

---

Les communications spécifiques entre les cellules du méristème sont essentielles lors de la transition florale. Le moyen le plus usuel de communication intercellulaire chez les végétaux est la voie symplasmique, qui utilise les plasmodesmes (Pds).

Chez *Sinapis*, la **fréquence des plasmodesmes** augmente très fortement dans le SAM de plantes induites à fleurir par un seul JL (Ormenese *et al.*, 2000). Cette augmentation est observée au niveau de toutes les couches cellulaires (L1, L2, L3) et à l'interface entre ces différentes couches, à la fois dans les zones centrale et périphériques du SAM. Les Pds supplémentaires sont formés de façon transitoire, entre la 28<sup>ème</sup> et la 48<sup>ème</sup> heure après le début du JL, et de façon acropète puisque ce changement

est détectable dans L3, quatre heures avant qu'il n'apparaisse dans L1 et L2.

Il semble donc qu'à la transition florale, il y ait établissement d'un seul champ, au sein du SAM, présentant une connexion intercellulaire accrue. Cet événement semble être le résultat de l'arrivée précoce, au niveau du SAM, du stimulus floral d'origine foliaire.

Ces Pds nouvellement formés sont d'origine secondaire<sup>15</sup>. En effet, la vague d'augmentation de l'index mitotique précède de 12 h celle de l'augmentation de la fréquence des Pds (Jacqumard *et al.*, 1998). De plus, cette augmentation est visible sur toutes les parois, incluant les parois qui ne dérivent pas de divisions récentes, comme les parois péricleines séparant les différentes couches cellulaires.

Par ailleurs, la CK (BA), appliquée au niveau du bourgeon apical, est capable d'accroître la fréquence des Pds. Cette hormone semble donc impliquée dans la régulation de la formation des Pds secondaires<sup>16</sup>. Cependant la CK ne mime pas parfaitement les effets du JL sur l'augmentation de la fréquence des Pds. Il semble donc que ces effets du JL sont dus à l'action conjuguée de la CK et d'un (ou plusieurs) autre(s) composant(s) du stimulus floral. Le saccharose pourrait être le premier candidat à ce partenariat avec la CK (Ormenese, 2001, Thèse de doctorat, Ulg).

Toutefois, il est abusif de faire des prédictions sur les capacités de transport symplasmique en se basant exclusivement sur la fréquence des Pds. En effet, de telles prédictions présument implicitement que cette capacité est identique pour tous les Pds de la plante.

<sup>15</sup> Les plasmodesmes primaires sont formés durant la cytokinèse, au niveau où la nouvelle paroi séparant les deux cellules-filles s'établira. Les plasmodesmes secondaires ne se forment pas au cours de la cytokinèse mais *de novo* au travers de parois existantes, impliquant l'action de cellulases, d'hémicellulases et de pectinases.

<sup>16</sup> Et peut-être aussi des Pds primaires.

C'est la raison pour laquelle Ormenese *et al.* (2002) ont étudié les modifications du **champ symplasmique** superficiel et central à l'intérieur de SAM de *Sinapis*, végétatifs et en transition florale. Les domaines symplasmiques sont visualisés par la microinjection d'une sonde fluorescente imperméable aux membranes – Lucifer Yellow CH (LYCH) – au sein d'une cellule au centre de la tunica et par le suivi de la propagation symplasmique de cette sonde dans le SAM. La microinjection est réalisée par iontophorèse – un courant électrique entraîne les molécules fluorescentes dans la cellule microinjectée.

---

On constate que, malgré l'augmentation uniforme de la fréquence des plasmodesmes dans l'ensemble du SAM de *Sinapis* en transition florale, le SAM est loin de constituer un unique champ symplasmique.

---

Dans le SAM végétatif, un champ symplasmique est présent en surface, au centre du méristème, isolant les cellules de la zone centrale de celles de la zone périphérique. Dans la majorité des cas, ce champ symplasmique présente une forme triangulaire et est de relativement petite taille. Dans de rares cas, le champ symplasmique central fusionne transitoirement avec un petit segment symplasmique en périphérie du SAM. Le corridor symplasmique résultant de cette fusion pourrait être utilisé pour le trafic de signaux de morphogenèse entre le centre et la périphérie du SAM, servant, entre autres, à l'établissement d'un nouveau groupe de cellules « fondatrices » d'une future feuille.

Chez des plantes induites à fleurir par un seul JL, ce champ symplasmique change de forme et de taille, au cours des deux premiers JC suivant le JL. La forme triangulaire du champ symplasmique superficiel et central du SAM végétatif est transformée, *via* une forme intermédiaire irrégulière, en une forme circulaire dans le SAM induit à fleurir. La taille de ce champ symplasmique est également grandement accrue, à la fois en valeur absolue et proportionnellement à la surface du SAM dont la taille a, elle aussi, augmenté (au 2<sup>ème</sup> jour).

Le changement de forme du champ symplasmique pourrait être lié à l'accroissement de la complexité phyllotactique du SAM en transition



florale. L'augmentation de taille reflète un changement de la balance entre le centre du SAM et la périphérie, qui accompagne la transition de la formation des feuilles vers celle des fleurs – il est possible que des cellules du champ symplasmique central, dont la taille augmente, soient relâchées dans la zone périphérique où elles pourraient être recrutées pour l'initiation des premiers primordiums floraux.

Ces résultats infirment clairement la conclusion tirée d'après l'observation de l'augmentation uniforme de la fréquence des plasmodesmes – l'établissement d'un seul champ symplasmique au sein du SAM en transition florale. Ce qui confirme l'idée qu'il est abusif de corréler fréquence des plasmodesmes et communications symplasmiques.

Cette étude des communications symplasmiques ne renseigne pas sur l'existence d'autres champs symplasmiques au sein du SAM – végétatif ou induit. Cependant, à l'instar de SAM d'autres espèces (Rinne & Van der Schoot, 1998 ; Van der Schoot & Rinne, 1999), il est vraisemblable que ces divers champs existent dans le SAM de *Sinapis*. Plusieurs champs symplasmiques pourraient donc se chevaucher au sein du SAM.

En effet, on ne peut exclure que les molécules de poids moléculaire inférieur à celui du LYCH (comme l'AIA, le saccharose, ...), nécessaires à la vie des cellules, puissent être transportées symplasmiquement dans tout le SAM et que le champ symplasmique révélé par cette sonde microinjectée dans une cellule de la tunica soit dû à un « seuil limite d'exclusion<sup>17</sup> » qui limite son transfert dans l'ensemble du SAM. Par ailleurs, les molécules de poids moléculaires supérieurs à celui du LYCH pourraient avoir un transport plus limité que celui-ci.

---

<sup>17</sup> Seuil limite d'exclusion (SEL): poids moléculaire de la plus grosse molécule capable de transiter passivement au travers du Pd. Le SEL basal a été observé comme étant de l'ordre de 0.8 à 1 kDa pour un grand nombre de types cellulaire et d'espèce de plantes (Robards & Lucas, 1990 - repris de Ormenese, 2001, Thèse de doctorat, Ulg).

## ■ Le stimulus floral de nature multifactorielle

La nature du stimulus floral est un problème controversé depuis que Chailakhyan (1936) a émis l'hypothèse que ce stimulus est une hormone nouvelle et spécifique, qu'il a appelée le « **florigène** ». A ce jour, cette hormone putative n'a pu être isolée malgré les efforts considérables déployés à cette fin (Bernier *et al.*, 1981a ; 1998). Ceci a conduit certains auteurs à se tourner vers d'autres hypothèses.

Ainsi, pour Sachs & Hackett (1983), l'induction florale – quel(s) que soi(en)t le ou les facteurs environnementaux requis – consisterait essentiellement à favoriser l'approvisionnement du SAM en assimilats de type glucides par rapport à d'autres parties de la plante. Cette hypothèse est connue sous le nom de « **détournement trophique** ».

Chez *Sinapis*, la figure 17 B indique clairement que les feuilles exposées au JL produisent et exportent un stimulus ou signal promoteur de floraison mais ce résultat ne donne aucune information sur la nature de ce signal. Le groupe du Professeur Bernier a attaqué ce problème en suivant deux approches différentes et complémentaires. La première consiste à comparer les changements de composition de la sève phloémienne, xylémienne et des exsudats apicaux chez des plantes végétatives et des plantes induites par un JL. La seconde vise à décrire, pour les composants individuels de la sève qui exhibent une augmentation importante suite à l'induction florale, leurs effets sur l'activité du SAM végétatif (Bernier *et al.*, 1993). Ce travail est toujours en cours mais il a déjà permis de postuler que le **stimulus floral** chez *Sinapis* est **multifactoriel** (Bernier *et al.*, 1981b) et de décrire le rôle joué par deux des composants de ce stimulus.

### Saccharose

Les teneurs en saccharose augmentent très fortement (près de 4x) dans la sève phloémienne, xylémienne et les exsudats apicaux, entre la 8<sup>ème</sup> et la 12<sup>ème</sup> heure après le début du JL (Lejeune *et al.*, 1991 ; 1993 ; Havelange

*et al.*, 2000). Cette augmentation est temporaire et indépendante de la quantité d'énergie lumineuse reçue par les plantes induites.

Toutefois, des expériences d'incorporation de  $^{14}\text{C}$  ont montré que le saccharose exporté provient de la mobilisation de réserves déjà présentes dans la plante : l'export, vers l'apex, de nutriments récemment synthétisés (marqués au  $^{14}\text{C}$ ) n'est modifié ni avant, ni au moment où l'augmentation des teneurs en saccharose est détectable. Ces observations sont en accord avec la théorie de Sachs & Hackett (1983).

Les effets d'un apport accru en glucides sur le SAM de plantes végétatives ont été étudiés en soumettant des plantes à un (ou deux) jours courts de forte intensité (JCFI – irradiance accrue de 2,5 x). Ces plantes ne fleurissent pas, bien qu'elles aient reçu une quantité d'énergie lumineuse égale (ou supérieure) à celle reçue pendant un JL et bien que leur sève phloémienne et leur SAM soient également enrichis en saccharose (Havelange & Bernier, 1983 ; Corbesier, résultats non publiés). On détecte cependant chez ces plantes certains changements caractéristiques de la transition florale, comme par exemple, l'accroissement de la proportion de cellules cyclantes (Jacquard *et al.*, 1998).

---

Contrairement à l'idée de Sachs & Hackett, le surplus de saccharose à lui seul ne peut donc pas provoquer la floraison mais, par contre, ce dernier est capable de provoquer dans le SAM une partie des événements de la transition florale (Bernier *et al.*, 1993). Le fait que l'augmentation des teneurs en saccharose précède l'activation de processus très consommateurs d'énergie permet de lui attribuer un rôle « messagelike ».

---

## Cytokines

---

Une augmentation des teneurs en CK est observée dans la sève phloémienne et les exsudats apicaux (groupe de l'isopentényladénine – [9R]iP) aux alentours de la 16<sup>ème</sup> et 9<sup>ème</sup> heure après le début du JL respectivement. On constate également une augmentation des teneurs en

CK de la sève xylémienne dès la 9<sup>ème</sup> heure (groupe de la zéatine - [9R]Z).

Cette augmentation est importante (au moins 2-3 fois dans les exsudats apicaux) et temporaire (Lejeune *et al.*, 1988 ; 1994).

L'application d'une dose unique de CK (benzyladénine – BA) sur l'apex de plantes végétatives a montré que la CK n'induit pas la floraison mais est capable de provoquer certains changements liés à la transition florale : notamment l'augmentation en deux vagues de l'index mitotique, le raccourcissement de la durée de la phase S de réplication de l'ADN, ainsi que celui de la taille des réplicons (Bernier *et al.*, 1977, Houssa *et al.*, 1990 ; Jacqmar *et al.*, 1998). Il est à noter ici que les changements provoqués par la BA sont différents de ceux provoqués par le saccharose. De plus, l'application de deux JCFI (augmentation du saccharose) et d'une CK ne conduit pas à la floraison mais provoque des changements supplémentaires, comme par exemple le raccourcissement de la phase G1 du cycle cellulaire (Bernier *et al.*, 1993 ; Jacqmar *et al.*, 1998).

---

La CK semble donc être un deuxième composant du stimulus floral qui, tout comme le saccharose est nécessaire mais insuffisant pour induire la formation des primordiums floraux (Bernier *et al.*, 1981b, 1993).

---

## Autres composants

---

### - Gibbérellines

L'application d'une dose unique de gibbérellines (**GA<sub>3</sub>**) au SAM de plantes végétatives provoque l'activation du gène homéotique *SaMADS A*, comme c'est le cas chez les plantes induites par un JL ou chez les plantes restants en JC et recevant une CK (Bonhomme *et al.*, 2000). Malheureusement, la question de savoir si les GA sont des composants du stimulus floral chez *Sinapis* reste non résolue, l'application de GA en JC et d'un inhibiteur de la biosynthèse des GA en JL n'ayant pas permis de tirer de conclusions définitives.

## - Substances azotées

La sève phloémienne des plantes induites est également enrichie en substances azotées, comme la **glutamine** (Corbesier *et al.*, 2002) et la **putrescine** (Havelange *et al.*, 1996). Et ce, quelques heures après l'enrichissement en CK. Le DFMO, un inhibiteur de l'ornithine décarboxylase (ODC) – enzyme impliquée dans la synthèse de la putrescine – diminue très fortement la réponse florale des plantes soumises au JL, et supprime les activations de l'index mitotique et de la réplication de l'ADN dans le SAM. De plus, cet effet peut être réversé par une application exogène de putrescine aux racines. Il est probable que la putrescine coopère avec le saccharose et les CK dans le contrôle des changements affectant la prolifération cellulaire au sein du SAM des plantes induites.

Comme l'application de ces substances (glutamine, putrescine, GA) à des plantes végétatives ne provoque ni la floraison, ni une partie des événements de la transition florale - comme c'est le cas pour le saccharose et la CK - on ne peut pas actuellement les considérer comme des composants potentiels du stimulus floral.

## - Cations

Une autre modification est l'augmentation de l'export de trois cations, **K<sup>+</sup>**, **Mg<sup>++</sup>** et **Ca<sup>++</sup>**, dans la sève xylémienne suite à l'induction florale. Par contre, la sève phloémienne (exsudat provenant des feuilles matures) ne montre pas un tel enrichissement en cations.

Les exsudats apicaux, eux, montrent un enrichissement important en **Ca<sup>++</sup>** uniquement. Ce supplément de cations au sein du bourgeon apical ne provient pas de la sève phloémienne et a donc une origine apoplastique. Cette augmentation des teneurs en **Ca<sup>++</sup>** du bourgeon apical est transitoire et prend place à un moment où les divisions cellulaires sont très fortement

stimulées (1<sup>ère</sup> vague de mitoses). Il est probable que le supplément de  $\text{Ca}^{++}$  soit nécessaire pour la constitution de nouvelles parois cellulaires (Havelange & Bernier, 1993). Il est intéressant de constater que les changements observés au niveau de l'export de cations hors des racines sont fortement reliés aux changements du statut énergétique de la racine lors de la transition florale (augmentation des teneurs en saccharose).

## « Shoot-to-root-to-shoot physiological loop »

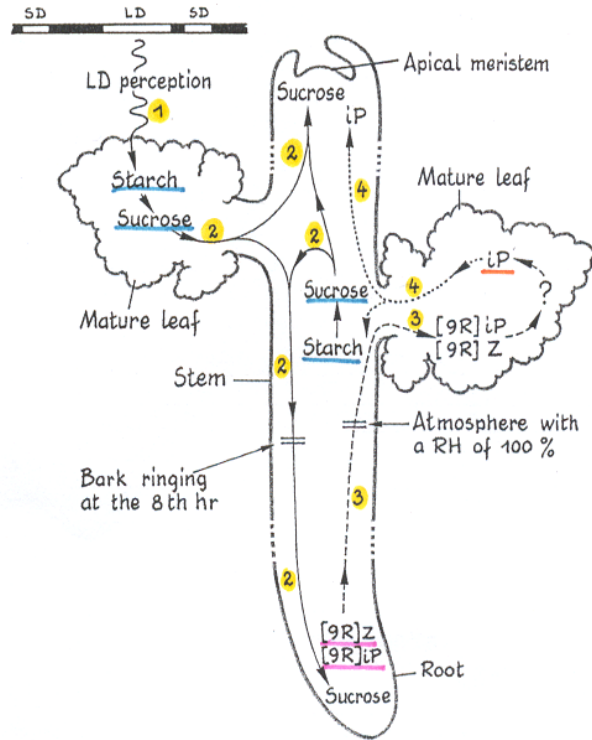
---

L'existence du mouvement d'un signal « shoot-to-root » a été démontrée par des expériences dans lesquelles l'inhibition de la floraison (de plantes induites par un JL) est causée par l'enlèvement d'un anneau de 2-4 mm de haut (entre les cotylédons et le système racinaire), contenant tous les tissus vivants dont le phloème (Bernier *et al.*, 1993). Cette inhibition, résultant de l'interruption du mouvement de ce signal, peut être compensée par une application d'une CK (BA) au niveau de l'apex. Ces dernières pourraient donc constituer le signal « root-to-shoot » impliqué dans la transition florale (Lejeune *et al.*, 1988 ; 1994).

Havelange *et al.* (2000) ont montré que les plantes ainsi annelées présentaient une réduction du niveau de sucres solubles au sein de la racine, et que l'effet inhibiteur de floraison pouvait être complètement levé en fournissant du saccharose aux racines, entre la 8<sup>ème</sup> et la 12<sup>ème</sup> heure après le début du JL. Le saccharose est donc le signal « shoot-to-root » essentiel à la floraison. Ces auteurs ont montré que l'effet principal de l'augmentation des teneurs en saccharose de la racine est de stimuler le mouvement du signal « root-to-shoot » que constitue la [9R]Z, la CK prédominante de la sève xylémienne chez *Sinapis*. La figure 19 illustre le mouvement des différents signaux dans la plante.

D'autre part, l'augmentation de l'export de cations ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{++}$  et  $\text{Ca}^{++}$ ), dans la sève xylémienne pourrait être contrôlée par l'arrivée du saccharose provenant des feuilles. Il se pourrait que ce soit aussi le cas d'autres nutriments minéraux.

Ces résultats indiquent clairement qu'un « shoot-to-root-to-shoot physiological loop » est indispensable à la floraison de plantes intactes de *Sinapis*.



**Figure 19 :** diagramme illustrant le « shoot-to-root-to-shoot physiological loop » participant au contrôle de la transition florale chez *S. alba* et impliquant le saccharose et les cytokinines. (1) Perception du JL par les feuilles matures. (2) Mobilisation de l'amidon dans les feuilles et la tige, suivie du transport de saccharose dans le phloème vers le méristème apical et les racines. (3) Transport dans le xylème de la zéatine riboside ([9R]Z) et de l'isopentényladénine riboside ([9R]iP), des racines vers les feuilles. (4) Transport de l'isopentényladénine (iP) dans le phloème, des feuilles vers le méristème apical. (Repris de Bernier et al., 1993).

## ■ Conclusions

Le système d'induction de la floraison chez *Sinapis* est donc particulièrement approprié pour nos recherches, en raison du fait que le « timing » et la localisation de nombreux événements de la transition florale sont décrits avec précision. D'un point de vue physiologique, c'est certainement le système le mieux caractérisé et un des plus rapides.

On pourrait reprocher à ce système d'avoir été ignoré par l'étude génétique du contrôle de la transition florale. Cependant, de nombreuses observations indiquent que les contrôles, génétiques comme physiologiques, présentent de grandes ressemblances entre les espèces voisines taxonomiquement que sont *Arabidopsis* et *Sinapis* (Bernier *et al.*, 1993 ; Corbesier *et al.*, 1996 ; 1998 ; 2002 ; Kania *et al.*, 1997). Ainsi, le peu de gènes identifiés chez *Sinapis* et impliqués dans la transition florale présentent un haut degré d'homologie avec des gènes d'*Arabidopsis* (Melzer *et al.*, 1995; Menzel *et al.*, 1996 ; Bonhomme *et al.*, 1997 ; Bonhomme *et al.*, 2000).

Cette similitude est un atout supplémentaire de ce système expérimental puisque les événements de la transition florale qui y sont détectés ont beaucoup de chances de se retrouver chez *Arabidopsis*.



# Résultats & Discussions



# Détection immunocytochimique des pectines

---

Le premier volet de nos résultats concerne la détection immunocytochimique des pectines dans le méristème de *Sinapis*. Pour cette étude, nous avons utilisé l'anticorps monoclonal 2F4, produit par F. Liners au sein de notre laboratoire (Liners *et al.*, 1989), et reconnaissant un épitope des pectines acides (homogalacturonanes) sous leur conformation en « boîtes à œufs » (Grant *et al.*, 1973). L'anticorps reconnaît les homogalacturonanes d'un DP de 9 minimum et d'un DE de 30 %, pour les pectines désestérifiées au hasard, à 40 % pour les pectines désestérifiées en blocs.

Nous avons tout d'abord étudié leur répartition au sein du méristème de *Sinapis* en microscopie électronique. Nous avons ensuite analysé leurs modifications au cours de la transition florale, en comparant la densité de marquage des pectines sur des apex végétatifs et induits à fleurir, prélevés à différents moments après le début du jour expérimental (JC ou JL). Enfin, afin de pouvoir distinguer les différentes zones du méristème, nous avons adapté la technique à la microscopie confocale et poursuivi l'analyse.

Les résultats concernant la répartition des pectines (microscopie électronique et optique), ainsi que leur modification au cours de la transition florale (microscopie électronique) sont présentés sous forme de deux articles (Sobry *et al.*, sous presse). La comparaison des intensités de marquage au sein des différentes zones de l'apex en microscopie optique est présentée à la suite.

## ■ Procédure

Le détail des techniques est présenté dans les deux articles présentés. Ce paragraphe ne reprend donc que ce qui n'y est pas décrit et permet de mieux situer les différentes analyses effectuées.

## Matériel

---

Les plantes de *Sinapis alba* sont cultivées depuis le semis dans les phytotrons de l'Institut de Botanique (ULg).

Pendant 9 semaines, les plantes sont maintenues à l'état végétatif par une culture en JC de 8 heures. Elles mesurent alors 20 à 25 cm et possèdent une quinzaine de feuilles. Lorsque les plantes sont âgées de 65 jours, elles sont prêtes pour l'induction florale par un JL.

## Article 1 – 1<sup>ère</sup> partie

---

Cette première partie concerne la répartition générale des pectines observée dans des méristèmes maintenus en conditions végétatives, quel que soit le moment du prélèvement. Nous n'avons en effet observé aucune différence à ce niveau entre les différents temps de prélèvement.

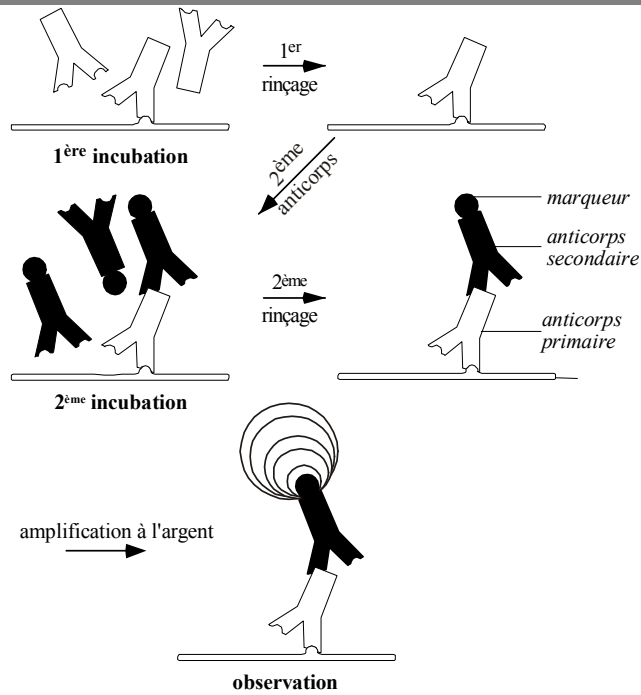
L'analyse a été effectuée en microscopie électronique et en microscopie optique.

- Les échantillons de la **microscopie électronique** ont été traités de la même façon que ceux du deuxième article présenté concernant la quantification des pectines : même méthode de fixation (glutaraldéhyde 3 %, tétr oxyde d'osmium 1 %), de marquage et d'observation.
- Les échantillons de la **microscopie optique** sont traités différemment :

La fixation utilisée (paraformaldéhyde 2 %, glutaraldéhyde 0,25 %) est tirée de l'article de Christensen et al. (1998). Elle a été choisie dans le but de pouvoir réaliser des marquages avec l'anticorps 2F4 anti-pectines et notre polysérum reconnaissant les PME sur les mêmes échantillons.

La technique de marquage a été adaptée pour permettre l'intensification du marquage à l'or colloïdal par une

précipitation d'argent et l'observation en microscopie confocale (Fig. 20).



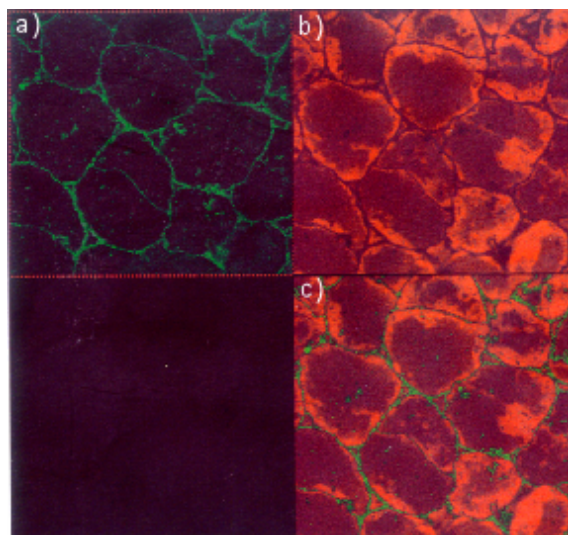
**Figure 20 :** méthode d'amplification du marquage à l'argent. Comme en microscopie électronique, les pectines sont localisées par le système de marquage indirect :

- 1) incubation des coupes avec l'anticorps primaire (de souris) spécifique des pectines (2F4)
- 2) Détection des complexes antigène-anticorps par des anticorps secondaires (anti-IgG de souris) dirigés contre les premiers anticorps et couplés à un marqueur dense aux électrons, l'or colloïdal, permettant la détection de l'ensemble en microscopie électronique.
- 3) Amplification du marquage par une précipitation d'argent. Le signal peut ainsi être observé en microscopie optique.

L'observation est réalisée au microscope confocal (Leica TCS NT – G : 400 x). Comme observé sur la figure 21, les images d'autofluorescence des tissus fixés à la glutaraldéhyde (b - rouge) et de réflexion du laser sur les grains d'argent (a - vertes) sont enregistrées séparément puis superposées automatiquement

(c) par le programme associé au microscope (Confocal Assistant 4.02).

---



---

**Figure 21** : coupe de l'apex de *S. alba* désestérifiée au NaOH et observée après marquage des pectines au microscope confocal. Trois canaux sont enregistrés : a, b et c, comme décrit dans le texte.

## Article 2 – 2<sup>ème</sup> partie

---

Dans cette deuxième partie, nous avons quantifié le marquage observé en microscopie électronique dans les méristèmes végétatifs et induits à fleurir prélevés toutes les 4 heures après le début du jour expérimental (début à 8h30 du matin).

La technique de fixation et de marquage est propre à la microscopie électronique. La méthode de quantification du marquage (mesure du nombre de grains d'or/ $\mu\text{m}^2$  de paroi) est décrite dans la partie « Matériels et méthodes ».

Cette expérience a été dupliquée avec augmentation de l'échantillonnage (3 objets/temps de prélèvement pour la première expérience et 5 pour la seconde).

## Microscopie optique - 3<sup>ème</sup> partie

---

Cette dernière partie concerne les résultats obtenus après mise au point de la méthode d'analyse des images de la microscopie confocale (voir Annexe 2).

Cette méthode d'analyse permet de comparer les intensités de marquage, ainsi que la surface occupée par les parois, dans une zone de l'apex par rapport à une autre pour les différents points de prélèvement, dans des apex végétatifs et induits à fleurir.

Les échantillons sont identiques à ceux présentés dans l'article 1.





# ■ Nature et localisation des pectines du méristème

*Protoplasma (2005), in press*

## Immunocytochemistry of pectins in shoot apical meristems

### Consequences for intercellular adhesion

Stéphanie SOBRY<sup>1</sup>, Andrée HAVELANGE<sup>2</sup>, and Pierre VAN CUTSEM<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Unité de Recherches en Biologie cellulaire Végétale, Département de Biologie, Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix, rue de Bruxelles 61, B-5000 Namur, Belgium.

<sup>2</sup> Laboratoire de Physiologie Végétale, Département des Sciences de la Vie, Université de Liège, Sart Tilman, B-4000 Liège, Belgium.

#### Abstract

The nature of pectins (acidic, methyl- or acetyl-esterified) in the shoot meristem of *Sinapis alba* was assessed using immunocytochemistry with the 2F4 monoclonal antibody in light and electron microscopy. This antibody is specific for “egg-boxes” – the polygalacturonic acid conformation induced by calcium as described in Liners *et al.* (1992, Plant Physiol. 99: 1099-1104). Hardly any acidic

pectin was detected in meristem walls; the pectins were largely methyl-esterified and esterified by acetyl groups and/or other esters. After *in situ* chemical or enzymatic de-esterification, labeling was distributed over the primary wall and the middle lamella of meristematic cells. Acidic pectin and  $\text{Ca}^{2+}$ -crosslinked homogalacturonans were absent from the pit fields, where plasmodesmata traverse the middle lamella. The type and distribution of pectins are

discussed in relation to cellular adhesion between active meristem cells.

### Key words

Adhesion - calcium gels - “egg-box” – *Sinapis alba* – meristem - pectin

### Abbreviations

HG = homogalacturonan;  
 PME = pectin methylesterase;  
 RGI = rhamnogalacturonan I;  
 RGII = rhamnogalacturonan II;  
 RT = room temperature;  
 XGA = xylogalacturonan;  
 GalA = galacturonic acid.

### Introduction

Pectin is a major component of the cell wall matrix of all land plants and consists of a range of galacturonic acid (GalA)-rich polysaccharides. Three pectic polysaccharides can be distinguished (homogalacturonan, rhamnogalacturonan I, and substituted galacturonan).

Homogalacturonan (HG) is a linear chain of (1→4) linked  $\alpha$ -D-galacturonic acid residues. Rhamnogalacturonan I (RGI) is composed of a backbone formed

by alternating  $\alpha$ -D-galacturonic acid and  $\alpha$ -L-rhamnose residues. The rhamnose residues can be substituted with neutral side chains such as galactans, arabinans and arabinogalactans. The substituted galacturonan referred to as rhamnogalacturonan II (RGII) is not structurally related to RGI, since its backbone is composed of (1→4) linked  $\alpha$ -D-galacturonic acid residues – like HG – attached to a cluster of four different side chains with very peculiar sugar residues. Unlike RGI, RGII seems to be covalently linked to HG chains. Another substituted galacturonan is xylogalacturonan (XGA) – a branched galacturonan with (1→3)- $\beta$ -D-xylose side chains (Ridley *et al.*, 2001). Immunocytochemical analysis using a monoclonal antibody (LM8) specific for XGA highly substituted with xylose indicates that this epitope is specifically associated with a plant cell separation process that results in complete cell detachment in a range of angiosperm species (Willats *et al.*, 2004).

The GalA residues of HG chains may be partially methyl-esterified. Pectic polymers are synthesized in a highly esterified form (degree of methyl-esterification > 70–80 %) (Jarvis, 1984; Liners & Van Cutsem, 1992) and de-esterified during the cell growth process (Femenia *et al.*, 1999). In addition, the degree of methyl-esterification can vary from one cell type to another, and the secondary alcohol groups of GalA residues can be esterified by acetyl and other groups, depending on the plant source (Ridley *et al.*, 2001).

The pectic matrix provides an environment for the deposition, slippage and extension of the glycan-cellulose network. It is implicated in the control of wall porosity and plays a major role in cell adhesion (Willats *et al.*, 2001a). Cellular cohesion, leading to cell and tissue interactions, is essential for morphogenesis, particularly at the shoot meristem level (Knox, 1992). However, the specific contribution of calcium pectate gels to cell adhesion is still a subject of controversy

(Goldberg *et al.*, 1996; Mollet *et al.*, 2000).

In this article, we present light and electron microscopy results obtained from immunolabeling of mustard (*Sinapis alba*) shoot apical meristem sections, using the 2F4 antibody that recognizes an epitope of acidic pectins (HGs) in a calcium-induced conformation (the “egg-box” model, Liners *et al.*, 1989, 1992). The type and distribution of pectins are discussed in relation to the importance of cellular adhesion observed at the level of an active meristem.

## Materials & methods

### *Growing conditions*

*Sinapis alba* L. plants (Etablissement Jardins, Nancy, France) were grown under 8 h short days, as described by Lejeune *et al.* (1988). Very High Output Sylvania fluorescent white lamps (Analis, Namur, Belgium) provided an irradiance of 150  $\mu\text{Mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  to the tops of the plants.

## ***Electron microscopy***

### *Tissue preparation*

Shoot apices (2 mm long) were collected and fixed in 3 % glutaraldehyde in 25 mM phosphate buffer (pH 6.8) at room temperature (RT) for 3 h and then overnight at 4°C. After several washes at 4°C in phosphate buffer, they were postfixed in 1 % OsO<sub>4</sub> in phosphate buffer at 4°C for 1 h, and then rinsed several times in buffer and water. After dehydration in a graded ethanol series, infiltration and embedding in LR White medium grade resin (London Resin Co. Ltd.) was performed, as previously described (Liners & Van Cutsem, 1992), before longitudinal sectioning.

Semithin sections (1–2 µm) thick were cut using a pyramitome 11800 (LKB), collected onto microscope slides on a drop of water and heat-fixed to the slides overnight at 40°C. Representative sections were stained with 0.5 % (w/v) toluidine blue in water for 30 s and rinsed in water. Thin sections (50 to 75 nm) were cut

on an ultratome III (LKB) and picked up on uncoated 300-mesh nickel grids. The observations performed with a Phillips EM 301 electron microscope at 60 kV and 5,500× magnification were restricted to the meristematic domes, characterized by small cells that are tightly attached and regularly arranged with large nuclei and small vacuoles.

### *Immunogold labeling*

Thin sections were labeled with 2F4 monoclonal antibodies, as described by Liners & Van Cutsem (1992). Briefly, after a 1 h blocking step with 5 % semi-skimmed milk in a Tris 20 mM/CaCl<sub>2</sub> 0.5 mM/NaCl 150 mM (Tris/Ca/Na) buffer at pH 8.2, the grids were incubated for 1 h with 2F4 ascites fluid (purified on protein G, 1 mg/ml), diluted 1:400 in Tris/Ca/Na buffer supplemented with 1 % semi-skimmed dried milk and 0.1 % Tween 20. The grids were then washed with the supplemented Tris/Ca/Na buffer and transferred into goat anti-mouse IgG-10 nm colloidal gold (Amersham) diluted 1:20 for 1 h, and further washed in a

continuous stream of buffer. Finally, the grids were stained with 2 % aqueous uranyl acetate and rinsed with ultrapure water (Millipore). The operations were carried out at RT.

### ***Light microscopy***

#### *Tissue preparation*

Shoot apices (2 mm long) with young leaves were collected and fixed in 2 % paraformaldehyde/0.25 % glutaraldehyde in 25 mM phosphate buffer (pH 6.8) at RT for 2 h and then at 4°C for 60 h. Finally, they were washed at 4°C in phosphate buffer and water. After dehydration in a graded ethanol series, infiltration and embedding in LR White medium grade resin (London Resin Co. Ltd.) was performed, as previously described (Liners & Van Cutsem, 1992), before longitudinal sectioning. Semithin sections (1 µm thick) were cut using a pyramitome 11800 (LKB) and collected on glass slides pre-treated with 2 % 3-aminopropyltriethoxysilane in acetone (Sigma).

### ***Immunogold labeling***

The sections were labeled with 2F4 monoclonal antibodies as described by Liners & Van Cutsem (1992) and Bush & McCann (1999), with some modifications. Briefly, after a 1 h blocking step with 5 % semi-skimmed milk in Tris/Ca/Na buffer, slides were incubated for 1 h with 2F4 supernatant, diluted 1:2 in supplemented Tris/Ca/Na buffer. They were then washed with the supplemented Tris/Ca/Na buffer and transferred into goat anti-mouse IgG-5 nm colloidal gold (goat anti-mouse IgG-H+L, British BioCell International) diluted 1:30 for 1 h and washed several times in buffer. For silver enhancement experiments, antibody complexes were cross-linked for 10 min with 1.0 % glutaraldehyde in Tris/Ca/Na buffer and then rinsed with several changes of ultrapure water (Millipore). Silver enhancement of 5 nm gold probes was performed for 13 min using the BioCell silver enhancement kit (British BioCell International), according to the manufacturer's

instructions. Slides were counterstained with 0.5 % basic fuchsin filtered through a 0.22  $\mu\text{m}$  filter and rinsed with ultrapure water. The operations were carried out at 20°C, and primary antibodies and supplemented buffer were centrifuged for 10 min at 7500 rpm before use. Finally, labeled sections were mounted with semi-permanent medium (Mowiol, Calbiochem). Observation was performed with a Leica TCS NT laser scanning confocal microscope, as described by Bush & McCann (1999). Images of autofluorescence (red) and epi-reflectance (green) were recorded separately and merged using Confocal Assistant 4.02 software.

### ***De-esterification treatments***

In some cases, thin sections were submitted to enzymatic and chemical treatments before immunolabeling for *in situ* de-esterification of pectins. Enzymatic de-esterification was carried out by incubating the sections with pectin methylesterase (PME from orange peel, EC 3.1.1.11,

Sigma; 25 units/ml in NaCl 100 mM at pH 7.5) for 30 min at RT (adapted from Vreeland *et al.*, 1989, with some modifications). For chemical de-esterification, the sections were incubated with 50  $\mu\text{l}$  0.05 M NaOH (pH 12.4) for 30 min at 4°C.

### ***Controls***

The specificity of the labeling was determined on the basis of the following controls: (a) incubation of NaOH de-esterified grids/slides with 2F4 primary antibody solutions (ascites fluid diluted 1:400 and supernatant diluted 1:2 for electron and light microscopy, respectively) pre-adsorbed at 4°C with polygalacturonic acid (P 3889, Sigma, St Louis, Mo., USA) at 200  $\mu\text{g/ml}$  in supplemented Tris/Ca/Na buffer for 1h before use – sections referred to as NaOH-Ctrl 1, and (b) incubation of NaOH de-esterified sections in supplemented Tris/Ca/Na buffer without primary antibody and then processed as usual – grids referred to as NaOH-Ctrl 2.

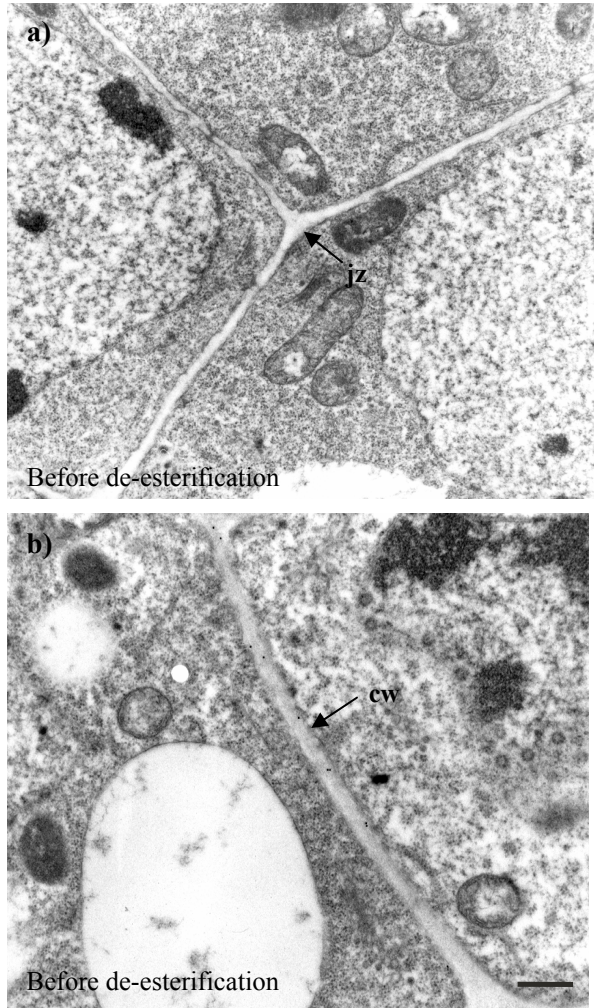
## Results

Two different parts of the cell walls were distinguished at the ultrastructural level: the “junction zones”, also called “cell wall corners”, and the rest of the walls between the cell corners or “cohesive walls”. The 2F4 labeling pattern of shoot meristem sections was examined by electron microscopy in junction zones and cohesive walls before and after on-grid enzymatic (PME) or chemical (NaOH) de-esterification treatment of pectins (Fig. 22). Labeling of untreated sections was very scarce (Fig. 22 a, b); only a few scattered gold particles were occasionally detected. Labeling with 2F4 antibodies was only detected after enzymatic or chemical de-esterification. The pectin labeling observed after de-esterification of the sections was uniformly distributed over both the primary cell walls and the middle lamella (Fig. 22 c, d, e, f). The labeling obtained after enzymatic de-esterification (PME treatment – Fig. 22 c, d) was generally weaker than that after chemical de-esterification

(alkali treatment – Fig. 22 e, f). Sodium hydroxide certainly would have had better access to pectin deep within the resin, but as antibodies are large proteins that can only access the surface of the section, this should not make much difference. It is more likely that PME cannot de-esterify pectin completely and are unable to hydrolyze esters other than methyl-esters. This suggests the presence, not only of methyl-esterified pectins, but also of acetyl-esterified and/or other esterified pectins in the meristems.

As the strong reflectance of silver-enhanced gold particles also enables the detection of weak gold labeling, we could observe very faint labeling in most meristematic cell walls of native sections in confocal microscopy (Fig. 23 a, b). However, acidic pectin and calcium gels were essentially absent from the walls of tightly adhered meristematic cells.

The labeling observed in light microscopy of enzymatically de-esterified sections is shown in Fig. 23 c and d.



**Figure 22 a, b:** Electron micrographs of cell walls in *S. alba* shoot meristem sections, immunogold labeled with mAb 2F4. (a) Three-way junctions – junction zones (jz). (b) Cohesive walls (cw). (a, b) Labeling before de-esterification. Bar = 500 nm

The silver enhancement step carried out in the confocal microscopy protocol reduces much of the difference in labeling intensity, resulting in similar labeling levels, whichever de-esterification

treatment was used (data not shown).

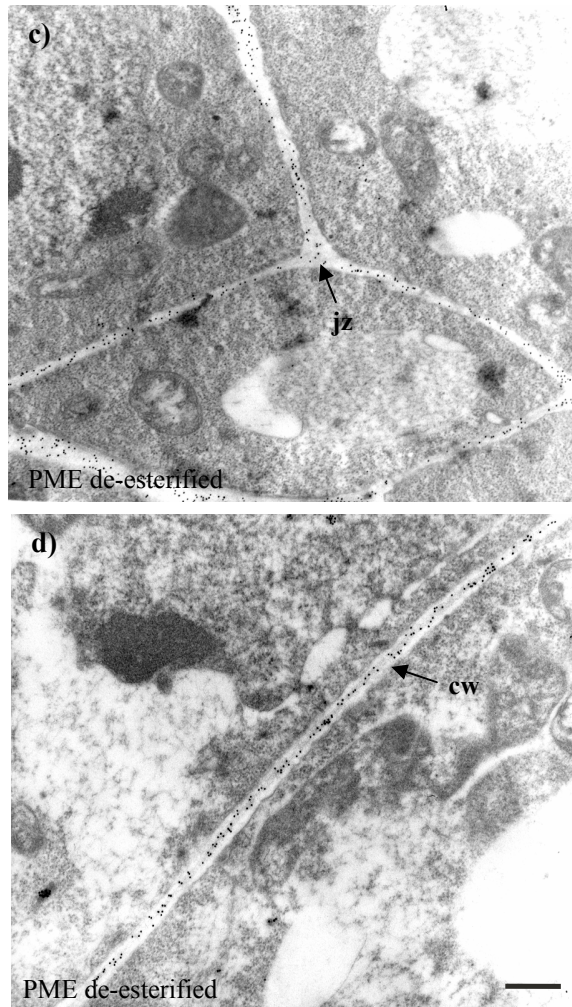
Labeling was, however, observed in electron micrographs of untreated sections in regions of lesser cohesion, such as the large



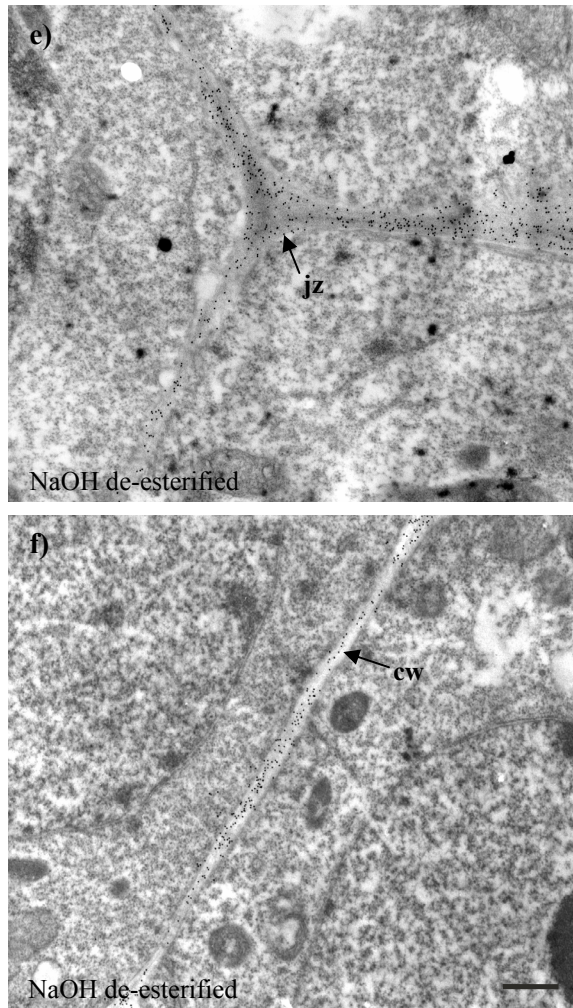
junction zones just under the meristematic dome (Fig. 24), and in untreated sections in the walls of vacuolated cells examined by confocal microscopy (Fig. 23 a, b).

The presence of calcium pectate

gel in this cell vacuolization zone, in contrast to its absence in the meristematic zone containing tightly adhered cells, already suggests that greater wall cohesion is not correlated with the presence of this type of gel.



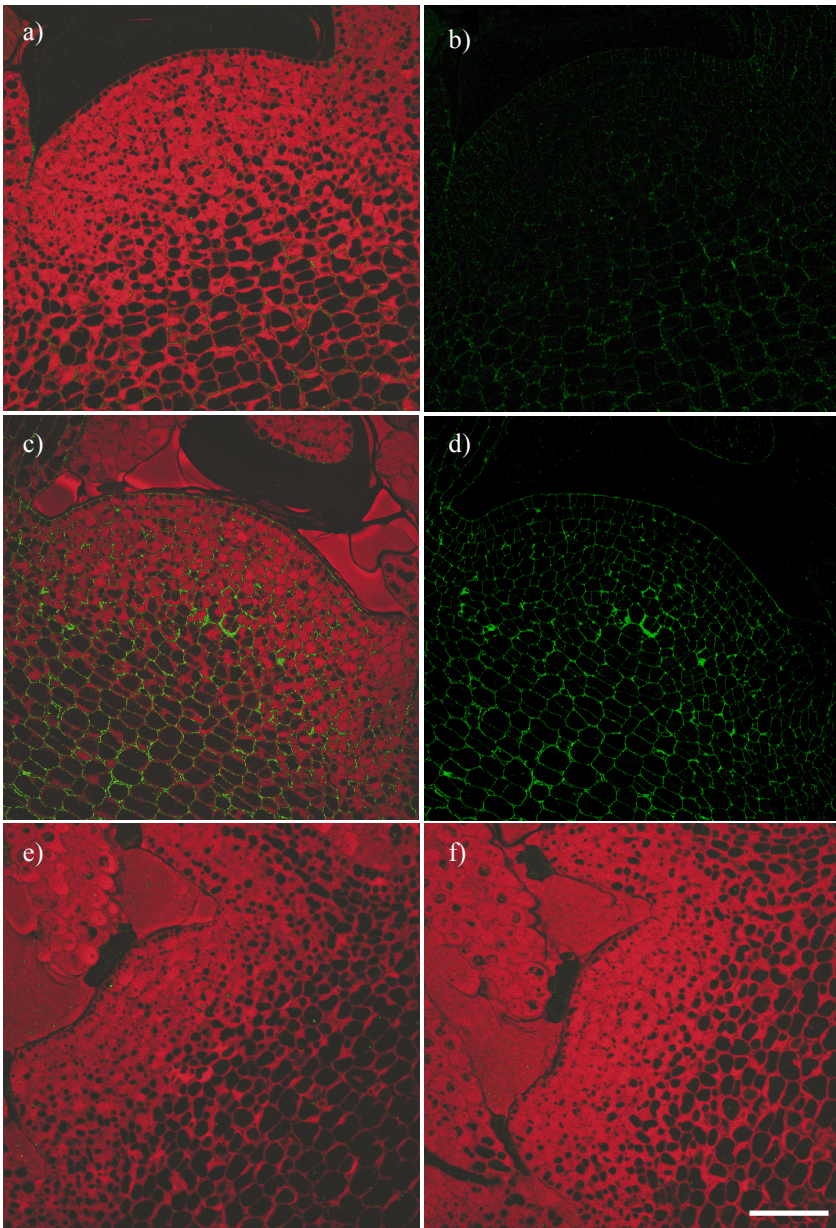
**Figure 22 c, d:** Electron micrographs of cell walls in *S. alba* shoot meristem sections, immunogold labeled with mAb 2F4. (c) Three-way junctions – junction zones (jz). (d) Cohesive walls (cw). (c, d) Labeling after enzymatic de-esterification with PME. Bar = 500 nm



**Figure 22 e, f:** Electron micrographs of cell walls in *S. alba* shoot meristem sections, immunogold labeled with mAb 2F4. (e) Three-way junctions – junction zones (jz). (f) Cohesive walls (cw). (e, f) Labeling after chemical de-esterification with NaOH. Bar = 500 nm

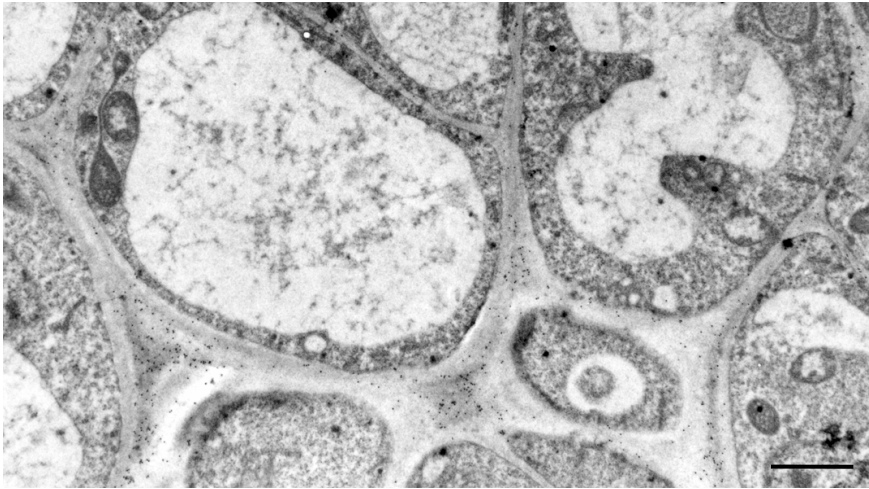
Pit fields, where plasmodesmata traverse the middle lamella, were not labeled by 2F4 in native sections (Fig. 25 a, b)

indicating the absence of acidic pectin crosslinked by calcium in such wall regions.



**Figure 23:** Confocal light micrographs of *S. alba* shoot meristem sections, immunogold labeled with mAb 2F4 and silver enhanced. (a, b) Native section, before de-esterification. (a) Merged images of autofluorescence and epi-reflectance, and (b) image of epi-reflectance alone. (c, d) Labeling after enzymatic de-esterification with PME. (c) Merged images of autofluorescence and epi-reflectance, and (d) image of epi-reflectance alone. (e, f) Verification of labeling specificity by (e) NaOH-Ctrl. 1: incubation of NaOH de-esterified slides with 2F4 primary antibody solution pre-adsorbed with polygalacturonic acid, and (f) NaOH-Ctrl. 2: incubation of NaOH de-esterified slides in supplemented buffer without primary antibody. Bar = 50  $\mu$ m





**Figure 24:** Electron micrograph of cell walls in the cell vacuolization region just under the *S. alba* shoot meristem, immunogold labeled with mAb 2F4 before de-esterification. Bar = 1  $\mu$ m

## Discussion

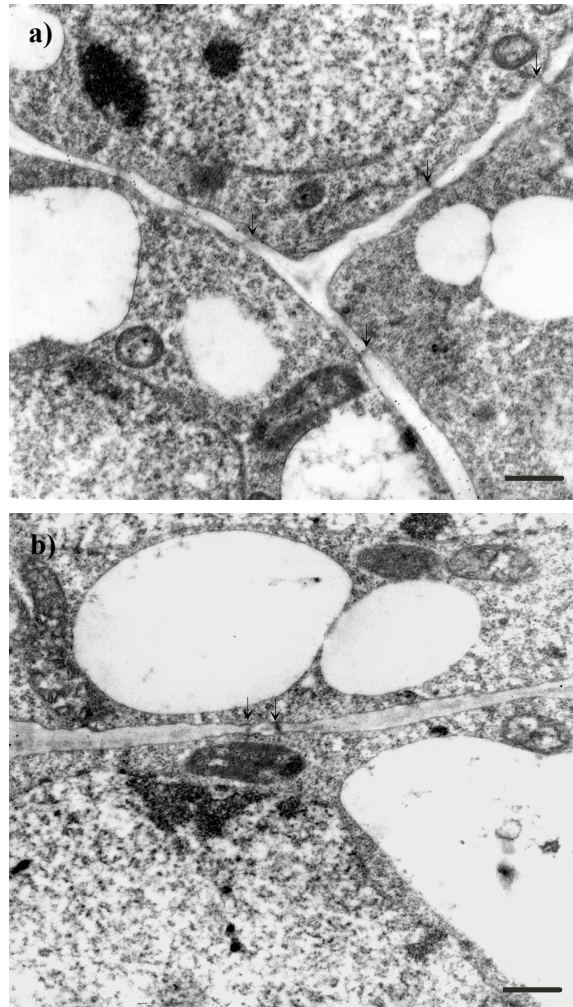
No pectin was detected on native sections by the 2F4 antibody, confirming the highly esterified nature of pectins in the shoot meristem. This is consistent with previous reports describing pectin as highly methyl-esterified at the time of its secretion in the cell wall (Liners & Van Cutsem, 1992), and its subsequent partial de-esterification during cellular differentiation (Femenia *et al.*, 1999). This has also been observed in elongating potato stolons (Bush *et al.*, 2001).

The uniform distribution of esterified pectin over both the primary cell walls and the

middle lamella is interesting because the middle lamella is frequently considered to be a distinct layer allowing cell adhesion through stiff gels formed by calcium bridging of de-esterified HGs (Vincken *et al.*, 2003; Willats *et al.*, 2001a, b). However, to our knowledge, these conclusions were not obtained from labeling of meristematic tissues at the ultrastructural level and they cannot explain cell adhesion in *S. alba* shoot meristems; the presence of both esterified pectins and low levels of  $\text{Ca}^{2+}$  in the meristems (Carpita & Gibeaut, 1993) rule out any significant contribution of calcium gels to the tight

adhesion observed between meristematic cells. On the other hand, while acid gel formation by highly methyl-esterified pectin in the absence of bivalent cations requires sucrose concentrations and low pHs (Jarvis, 1984) not usually found

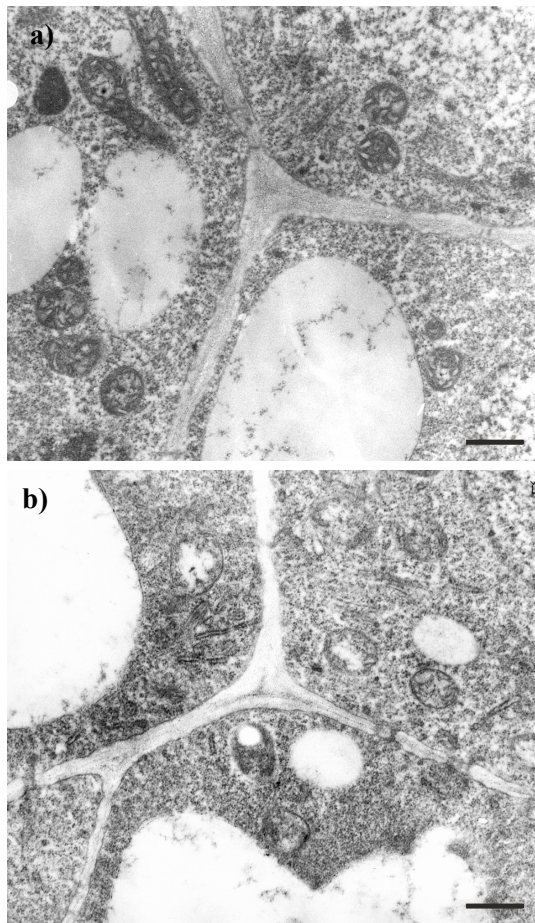
*in muro*, intermediate forms of soft acidic gels involving H-bonding and hydrophobic interactions can exist *in planta* and play an important role in cellular adhesion (Willats *et al.*, 2001a).



**Figure 25:** Electron micrographs of cell walls in *S. alba* shoot meristem sections. Absence of labeling with 2F4 at pit fields (arrows indicate plasmodesmata) before de-esterification, in (a) junction zone and (b) cohesive wall. Bar = 500 nm

The role of calcium-induced pectic gels in cellular adhesion has already been questioned using immunolabeling of carrot callus with the 2F4 antibody (Liners & Van Cutsem, 1992). This study showed that methyl-esterified pectin was most abundant in regions of tightly

adhered cells, such as the middle lamella far from junction zones. Acidic pectin was localized to regions of lesser cell cohesion, the expanded regions of the middle lamella, the three-way junctions between cells or in areas lining intercellular spaces.



**Figure 26:** Electron micrographs of cell walls in *S. alba* shoot meristem sections. Verification of labeling specificity by (a) NaOH-Ctrl. 1: incubation of NaOH de-esterified grids with 2F4 primary antibody solution pre-adsorbed with polygalacturonic acid, and (b) NaOH-Ctrl. 2: incubation of NaOH de-esterified grids in supplemented buffer without primary antibody. Bar = 500 nm

The use of the 2F4 antibody on compact and friable sugar beet callus has shown the importance of pectin esterification for cell adhesion (Liners *et al.*, 1994). In native *S. alba* apices, we observed that labeling was also present in regions of lesser cohesion, such as the large junction zones just under the meristematic dome. Acidic pectin is almost exclusively observed in this cell vacuolization zone but is absent from tightly adhered regions, such as the middle lamella far from junction zones or the wall between meristematic cells. Calcium pectate gels thus seem to be implicated at the level of cell separation and differentiation, contributing among others to minimal tissue cohesion and to the creation of appropriate ionic and porosity environments.

Pit field regions can be likened to spot welds that protect the delicate plasmodesmata from mechanical damage caused by cell expansion (Bush & McCann, 1999). The absence of 2F4 labeling suggests that adhesion at the vicinity of

plasmodesmata is also dependent on other types of linkage between matrix polysaccharides. Tight cell adhesion between *S. alba* shoot meristematic cells, especially at the level of microdomains such as pit fields, is thus undeniably independent of calcium pectate gels.

Several mechanisms that can play a role in intercellular adhesion in plants, apart from dimerization of HGs through calcium, have been described. Recent results suggesting an alternative model of pectin organization in the wall (Vincken *et al.*, 2003) and the development of immunological tools allowing the localization of various pectic epitopes in different systems indeed show that cell adhesion does not uniquely rely on calcium pectate gels.

Using the *Nicotiana plum-baginifolia* callus *nolac-H18* (non organogenic callus with loosely attached cells), characterized by a mutation in the gene *NpGUT 1* encoding glucuronyl transferase, Iwai *et al.* (2002) have shown that RGII

lacks both  $\beta$ -glucuronic acid and  $\alpha$ -L-galactose in the side chains, which prohibits borate dimerization. This results in a loss of callus cell adhesion and thereby prevents the organogenesis normally initiated by adventive shoot meristems. However, Matoh *et al.* (1998) have indicated that borate-diol esters of RGII are absent from the middle lamella of radish and rice roots, cultured tobacco cells, red clover root nodules and growing pollen tubes in lily, although RGII could be present but simply masked by a base-labile component (Ridley *et al.*, 2001).

The neutral arabinan side chains of RGI are known to anchor pectin in the wall (Iwai *et al.*, 2001) and are frequently associated with the cellular proliferation process, which requires good adhesion between cells (Bush *et al.*, 2001; Willats *et al.*, 1999). These arabinans are characteristic of very young tissues (McCartney *et al.*, 2000) and are able to interact with the cellulose-XG network (Thompson & Fry, 2000; Orfila *et al.*, 2002). Conversely, low arabinan

contents are characteristic of non-embryogenic calluses of *Daucus carota* and *nolac-H14*, another *N. plumbaginifolia* non-organogenic callus (Sato, 1998; Iwai *et al.*, 2001). Moreover, Orfila & Knox (2000) have shown that the density of the (1 $\rightarrow$ 5)- $\alpha$ -arabinan epitope increases in the inner face of walls at the "pit field" level, which suggests that these molecules could be involved in the strong adhesion observed in these microdomains.

It has also been suggested that HG chains could contribute to cell adhesion by crosslinking to other wall components through uronyl esters. These uronyl esters would be formed by pectin methylesterases that would catalyze a transesterification reaction, using methyl-esterified HG as a donor substrate (Vincken *et al.*, 2003; Ridley *et al.*, 2001). The presence of pectin-hemicellulose complexes that contain unidentified phenolic material has also been reported in cauliflower (Femenia *et al.*, 1999).



## Conclusions

Our results show that the tight adhesion observed between meristematic cells in the *S. alba* apical meristem is not due to the presence of polygalacturonic acid susceptible to crosslinking by calcium ions. This is in agreement with the work of Bush & McCann (1999) and Bush *et al.* (2001) who also used the 2F4 antibody, and with the work of Liners *et al.* (1992) on carrot callus. According to these authors, calcium gels are more often associated with cell separation at the middle lamella, rather than cell adhesion. Other pectic polysaccharides and linkages thus seem to be involved in the cellular adhesion process.

## Acknowledgements

Many thanks are due to Mrs. Ch. Devignon (Unité interfacultaire de microscopie électronique, FUNDP, Namur, Belgium) and C. Demazy for excellent technical assistance, and to F. Liners and G. Bernier for discussions and critical reading of the manuscript. The work reported here was supported by grants from FRIA (Fonds pour la Recherche

scientifique dans l'Industrie et l'Agriculture) to S. Sobry and from FRFC (Fonds de la Recherche Fondamentale et Collective – 2.4530.93). Thanks also to Springer-Verlag GmbH for having accepted publication on-line.

## References

- Bush MS, McCann MC** (1999) Pectic epitopes are differentially distributed in the cell walls of potato (*Solanum tuberosum*) tubers. *Physiol Plant* 107: 201–213
- Bush MS, Marry M, Huxham IM, Jarvis MC, McCann MC** (2001) Developmental regulation of pectic epitopes during potato tuberisation. *Planta* 213: 869–880
- Carpita NC, Gibeaut DM** (1993) Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J* 3(1): 1–30
- Femenia A, Waldron KW, Robertson JA, Selvendran RR** (1999) Compositional and structural modification of the cell wall of cauliflower (*Brassica oleracea* L. var botrytis) during tissue

development and plant maturation. Carbohydr Polym 39: 101–108

**Goldberg R, Morvan C, Jauneau A, Jarvis MC** (1996) Methyl-esterification, de-esterification and gelation of pectins in the primary cell wall. In: Visser J, Voragen AGJ (eds) Pectins and pectinases. Elsevier, Amsterdam, pp 151–172

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

**Iwai H, Masaoka N, Ishii T, Satoh S** (2002) A pectin glucuronyltransferase gene is essential for intercellular attachment in the plant meristem. PNAS 99(25): 16319–16324

**Jarvis MC** (1984) Structure and properties of pectin gels in plant cell walls. Plant Cell Environ 7: 153–164

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

**Lejeune P, Kinet J-M, Bernier G** (1988) Cytokinin fluxes during

floral induction in the long day plant *Sinapis alba* L. Plant Physiol 86: 1095–1098

**Liners F, Van Cutsem P** (1992) Distribution of pectic polysaccharides throughout walls of suspension-cultured carrot cells, an immunocytochemical study. Protoplasma 170: 10–21

**Liners F, Letesson J-J, Didembourg C, Van Cutsem P** (1989) Monoclonal antibodies against pectin. Plant Physiol 91: 1419–1424

**Liners F, Thibault J-F, Van Cutsem P** (1992) Influence of the degree of polymerization of oligogalacturonates and of esterification pattern of pectin on their recognition by monoclonal antibodies. Plant Physiol 99: 1099–1104

**Liners F, Gaspar T, Van Cutsem P** (1994) Acetyl- and methyl-esterification of pectins of friable and compact sugar-beet calli: consequences for intercellular adhesion. Planta 192: 545–556

**Matoh T, Takahashi M, Takabe K, Kobayashi M** (1998) Immunocytochemistry of rhamnogalacturonan II in cell walls of

higher plants. *Plant Cell Physiol* 39: 483–491

**McCartney L, Ormerod AP, Gidley MJ, Knox JP** (2000) Temporal and spatial regulation of pectic (1→4)-β-D-galactan in cell walls of developing pea cotyledons: implications for mechanical properties. *Plant J* 22(2): 105–113

**Mollet J-C, Park S-Y, Nothnagel EA, Lord EM** (2000) A lily stylar pectin is necessary for pollen tube adhesion to an in vitro stylar matrix. *Plant Cell* 12: 1737–1749

**Orfila C, Knox JP** (2000) Spatial regulation of pectic polysaccharides in relation to pit fields in cell walls of tomato fruit pericarp. *Plant Physiol* 122: 775–781

**Orfila C, Huisman MM, Willats WG, van Alebeek GJ, Schols HA, Seymour GB, Knox JP** (2002) Altered cell wall disassembly during ripening of Cnr tomato fruit: implications for cell adhesion and fruit softening. *Planta* 215(3): 440–447

**Ridley BL, O'Neill MA, Mohnen D** (2001) Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonides-related

signaling. *Phytochemistry* 57: 929–967

**Satoh S** (1998) Functions of the cell wall in the interaction of plant cells: analysis using carrot cultured cells. *Plant Cell Physiol*, 39(4): 361–368

**Thompson JE, Fry SC** (2000) Evidence for covalent linkage between xyloglucan and acidic pectins in suspension-cultured rose cells. *Planta* 211: 275–286

**Vincken J-P, Schols HA, Oomen RJEJ, McCann MC, Ulvskov P, Voragen AGJ, Visser RGF** (2003) If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. *Plant Physiol* 132: 1781–1789

**Vreeland V, Morse SR, Robichaux RH, Miller KL, Hua ST, Laetsch WM** (1989) Pectate distribution and esterification in *Dubautia* leaves and soybean nodules, studied with a fluorescent hybridization probe. *Planta* 177: 435–446

**Willats WGT, Steele-King CG, Marcus SE, Knox JP** (1999) Side chains of pectic polysaccharides are regulated in relation to cell

proliferation and cell differentiation. *Plant J* 20(6): 619–628

**Willats WGT, McCartney L, Mackie W, Knox JP (2001a)** Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Mol Biol* 47(9): 9–27

**Willats WGT, Orfila C, Limberg G, Buchholt HC, van Alebeek G-J, Voragen AGJ, Marcus SE, Christensen TMIE, Mikkelsen JD, Murray BS, Knox JP (2001b)** Modulation of the degree and pattern of methyl-esterification of pectic homogalacturonan in plant cell walls. *J Biol Chem* 276 (22): 19404–19413

**Willats WG, McCartney L, Steele-King CG, Marcus SE, Mort A, Huisman M, Van Alebeek GJ, Schols HA, Voragen AG, Le Goff A, Bonnin E, Thibault JF, Knox JP (2004)** A xylogalacturonan epitope is specifically associated with plant cell detachment. *Planta* 218(4): 673–68

## ■ Modification des pectines au cours de la transition florale

*Physiologia Plantarum* (2005), 123: 339-347

### Immunolocalization of homogalacturonans in the apex of the long-day plant *Sinapis alba* L. at floral transition

#### The pectin content drops dramatically in the first hours of this transition

Stéphanie SOBRY<sup>1</sup>, Andrée HAVELANGE<sup>2</sup>, Françoise LINERS<sup>1</sup> and Pierre VAN CUTSEM<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Unité de Recherches en Biologie cellulaire Végétale, Département de Biologie, Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix, rue de Bruxelles 61, B-5000 Namur, Belgium.

<sup>2</sup> Laboratoire de Physiologie Végétale, Département des Sciences de la Vie, Université de Liège, Sart Tilman, B-4000 Liège, Belgium.

#### Abstract

The pectin content in the meristem of *Sinapis alba* at flowering transition has been assessed in electron microscopy using immuno-cytochemistry and the monoclonal antibody 2F4 that recognizes a Ca<sup>2+</sup>-induced supramolecular conformation of homogalacturonans (Liners *et al.*, 1989, 1992). The meristem's

pectins are not recognized at all by the 2F4 MoAb unless they are enzymatically (PME : pectin methylesterase) or chemically (NaOH) de-esterified, indicating that native pectin must be largely esterified in the apical meristem. A striking but transient decrease of the homopolysaccharonic content of the meristem's cell walls occurred between 20 and 24

hours after start of the inductive LD. These changes suggest a role for pectin in floral transition.

### Key words

Apical meristem, development, electron microscopy, floral transition, immunolocalization, pectin, *Sinapis alba*.

### Abbreviations

SAM = shoot apical meristem,  
PME = pectin methylesterase,  
LD = long-day, SD = short-day,  
cw = cohesive wall,  
jz = junction zone,  
DE = degree of esterification,  
DP = degree of polymerization.

---

### Introduction

During the past decade use and development of monoclonal antibodies directed against pectic polysaccharides has led to important insights into the functions, organization and architecture of the plant cell wall in a developmental context (Willats *et al.*, 1999, 2000).

One of the most dramatic developmental transitions in higher plants is the switch-over from leaf to flower formation at

the shoot apical meristem (SAM). However, despite the great amount of work devoted to this transition (Bernier, 1988; Sussex, 1989; Lyndon, 1998; Mouradov *et al.*, 2002; Périlleux & Bernier 2002) little is known so far about the changes possibly affecting the cell wall in the transitional SAM.

Our aim in the present study was to look for changes in the content and composition of one important wall component, the pectins, in the SAM during this transition. We used an antibody specific of homopolysaccharuronic sequences (Liners *et al.*, 1989, 1992) and a whole-plant experimental system in which the floral transition is easily controlled and of short duration. This system is the long day (LD) plant *Sinapis alba*, a member of the mustard family, which can be induced to flower by exposure to a single LD. In response to this LD a floral stimulus is exported to the SAM during the period extending from h 16 to h 28 after start of the LD (Bernier, 1989). Floral meristems are finally initiated

by the SAM roughly two days after arrival of the floral stimulus. Another advantage of this experimental system is that numerous events taking place in the transitional SAM have already been precisely described. Events of particular interest in relation to the cell wall are the increase in the frequency of cell division, the frequency of plasmodesmata and in the number of dictyosome per cell. The frequency of cell division increases in two waves, an early one occurring between h 16 and h 36 after beginning of the LD and a late one from h 44 to h 76 (Jacqmard *et al.* 1998). The number of dictyosomes per cell also starts to increase quite early, at h 18, but is increasing steadily until h 60 (Havelange *et al.*, 1974). Since these events start in the SAM well before the movement of the floral stimulus is completed, it has been assumed that they are caused by an early-moving component of the floral stimulus (Bernier, 1988).

A later event, observed in the transitional SAM during the period extending from h 28 to h

48, is an increase in plasmodesmata frequency (Ormenese *et al.*, 2000). Since this increase occurs in between the two waves of cell division and since it is observed in all cell walls, including in walls not deriving from recent divisions (periclinal walls separating the cell layers), it appears that the extra plasmodesmata are essentially formed in existing walls and thus are of secondary origin (Lucas *et al.*, 1993). Plasmodesmata provide a communication channel between adjacent cells (Cilia and Jackson, 2004) and, in a further study using microinjection of a fluorescent probe, it has been observed that the superficial central symplasmic field within the SAM undergoes radial alterations in size and shape starting at h 24-32 after beginning of the inductive LD (Ormenese *et al.*, 2002). These modifications in the frequency of secondary plasmodesmata and in the trafficking pattern through these plasmodesmata could not have taken place without deep changes at the cell wall level, including pectin content and/or composition

(Kollmann & Glockmann, 1991; Ding & Lucas, 1996).

In this study, we show that in the *Sinapis* SAM pectins undergo considerable and early modifications during the switch-over from the vegetative to the reproductive stage.

## Materials and methods

### *Growing conditions and computation of time*

Plants of *Sinapis alba* L. (Etablissement Jardins, Nancy, France) were kept vegetative by growing them under 8 h short days (SDs), as described by Lejeune *et al.* (1988). When two months old, they were induced to flower by a single 22 h LD and then returned to the SD regime. These plants will be referred to as “induced” in contrast to “control” or “vegetative” plants that were kept continuously under SD conditions. Time in this investigation is computed from start of the experimental day.

### *Electron microscopy*

#### *Tissue preparation*

Shoot apices two mm-long from

control SD plants and from plants exposed to the LD were collected 12, 16, 20 and 24 h after start of the experimental day. Time-points 4 and 8 h were only collected for control plants since until the end of the first eight hours of the day, control and induced plants are identical, the extension of the light period for the batch of induced plants (termed photoextension) having not yet begun. Three apices were collected per sampling time. A second batch of plants were collected at h 48 after start of the experimental day and processed separately. The apices were processed for microscopy according to Liners *et al.* (1994) and Bush *et al.* (2001) with some modifications. Briefly, they were fixed in 3 % glutaraldehyde in 25 mM phosphate buffer (pH 6.8) at RT for 3 h and then overnight at 4°C. After several washings at 4°C in phosphate buffer, they were postfixed in 1 % OsO<sub>4</sub> in phosphate buffer at 4°C for 1 h, rinsed several times in buffer and water. After dehydration in a graded series of ethanol, infiltration and embedding in LR White resin medium grade



(London Resin Co Ltd) was performed before longitudinal sectioning, as previously described (Liners & Van Cutsem, 1992). The whole experiment was duplicated.

Semithin sections 1-2  $\mu\text{m}$  thick were cut using a pyramitome 11800 (LKB), collected onto microscope slides on a drop of water and heat-fixed to the slides overnight at 40°C. Representative sections were stained with 0.5 % (w/v) toluidine blue in water for 30 s and rinsed in water. Thin sections (50 to 75 nm), restricted to the meristematic dome characterized by tightly attached and regularly arranged small cells with large nuclei and small vacuoles (Fig. 27 a), were cut on an ultratome III (LKB) and picked up on uncoated 300-mesh nickel grids. The observations were performed with a Philips EM 301 electron microscope at 60 kV at a 5,500 magnification.

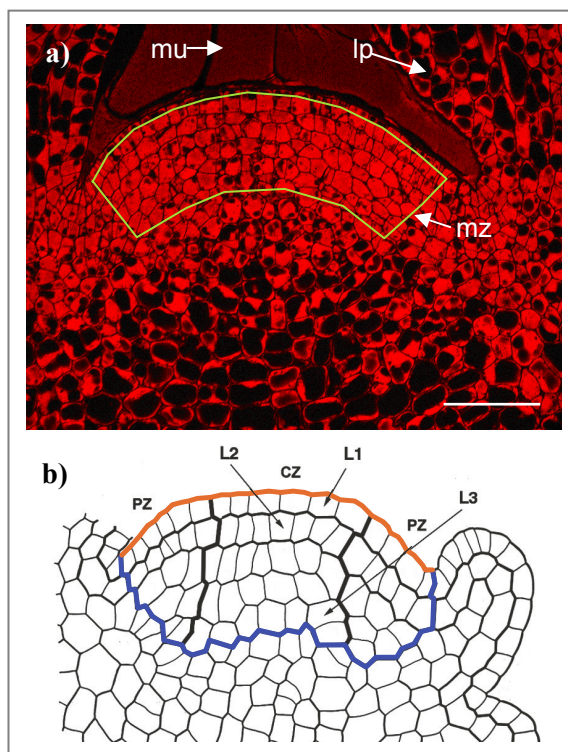
#### *Immunogold labeling*

Thin sections were labeled with 2F4 monoclonal antibodies as described by Liners & Van

Cutsem (1992). Briefly, after a 1 h blocking step with 5 % half-skimmed milk in a Tris 20 mM/CaCl<sub>2</sub> 0.5 mM/NaCl 150 mM (Tris/Ca/Na) buffer at pH 8.2, the grids were incubated for 1 h with 2F4 ascites (purified on protein G, 1 mg/ml) diluted 400 times in Tris/Ca/Na buffer supplemented with 1 % half-skimmed dried milk and 0.1 % Tween 20. The grids were then washed with the supplemented Tris/Ca/Na buffer and transferred into goat anti-mouse IgG-10 nm colloidal gold (Amersham) diluted 20 times for 1 h and further washed in a continuous stream of buffer. Finally, the grids were stained with 2 % aqueous uranyl acetate and rinsed with ultrapure water. The operations were carried out at RT.

#### *De-esterification treatments*

In some cases, thin sections were submitted to enzymatic or chemical treatments for *in-situ* de-esterification of pectins before immuno-labeling. Enzymatic de-esterification was carried out by incubating the sections with pectin méthylestérase (PME from



**Figure 27:** (a) light micrograph of a *Sinapis* shoot apical section showing the meristematic area selected for electron microscopy analysis. The autofluorescence of the tissue was observed with a Leica TCS NT laser scanning microscope. Bar = 50  $\mu$ m, mu: mucus, lp: leaf primordium, mz: meristematic zone. (b) Diagram showing the different areas in the SAM (adapted from Ormenese *et al.*, 2000, with some modifications): the three cell layers (L1, L2 and L3) and the peripheral (PZ) and central (CZ) zones, bordered by black thick line. Blue thick line indicates the border of the meristematic area. Orange-colored thick line indicates cell wall of the epidermis.

orange peel, EC 3.1.1.11 – Sigma - 25 units/ml in NaCl 100 mM at pH 7.5) for 30 min at RT (adapted from Vreeland *et al.*, 1989, with some modifications). For chemical de-esterification, the sections were incubated with 50  $\mu$ l 0.05 M NaOH (pH 12.4) for 30 min at 4°C.

These de-esterification conditions were determined in previous studies (Liners & Van Cutsem, 1992; Liners *et al.*, 1994) and on diverse plant systems (Willats *et al.*, 2001b).

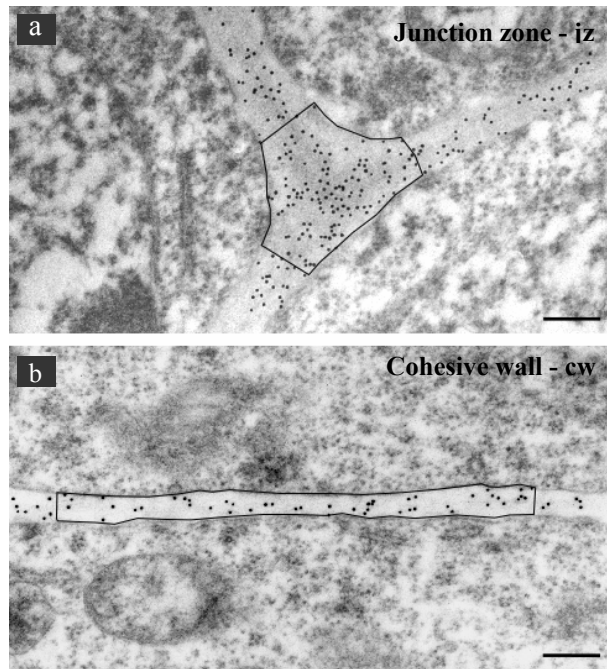
### Controls

The specificity of the labeling was determined on the basis of

the following controls: (a) incubation of NaOH de-esterified grids with 2F4 primary antibody solutions (ascites diluted 1:400) pre-adsorbed at 4°C with polygalacturonic acid (P 3889 - Sigma, St Louis, Mo., USA) at 200 µg/ml in Tris/Ca/Na-supplemented buffer for 1h before use, and (b) incubation of NaOH de-esterified grids in Tris/Ca/Na supplemented buffer without primary antibody and then processed as usual.

### ***Quantitative analysis of labeling***

Two different parts of the walls could be distinguished: the junction zones (jz) also called cell wall corners and the rest of the cell walls or cohesive walls (cw) between the cell corners (Fig. 28). These two domains of the wall are usually labeled differently by the 2F4 antibodies (Liners *et al.*, 1994).



**Figure 28:** delimitation of junction zone (jz) and cohesive walls (cw) between cells of *Sinapis alba* SAMs. Bar = 500 nm.

Three apices were analyzed per sampling time in the first experiment and five in the second.

Three grids were selected from each apex, one for pectin methylesterase (PME) treatment, one for the NaOH treatment and another non-de-esterified. On each grid, two different sections were selected in which a minimum of three wall areas and three cell corners were observed.

The images acquired in electron microscopy were digitized and stored on compact disk for analysis. Gold particles were counted on areas defined as shown in Fig. 28. The surface areas and number of gold particles were measured on a Macintosh computer using NIH Image 1.55 b 57 software (977 measurements for the first experiment and 1438 for the second). The density of labeling associated with junction zones and cohesive walls was calculated and expressed as the number of gold particles per  $\mu\text{m}^2$ .

Mean values were compared by confidence interval and

Student's t-test at the 5 % level of significance. In the case of statistically non-normal populations or populations with unequal variances, a Mann-Whitney Rank Sum test was used at the same level of significance. All the statistics were performed using the statistic software SigmaStat (Jandel Scientific).

## Results

The apices of plants kept vegetative in SDs (controls) and of plants induced to flower by one LD were analyzed by immunocytochemistry using the 2F4 antibody (Liners *et al.*, 1989, 1992) that binds a calcium-induced supramolecular conformation of homopolygalacturonic acid of  $\text{DP} \geq 9$  called the « egg-box model » (Grant *et al.*, 1973). All controls were negative (data not shown; Sobry *et al.*, in press). Gold labeling was nearly never observed in untreated apices, whether induced or not. This is a common observation with higher plant apices as was previously found in SAM of *Sinapis alba* (Sobry *et al.*, in press).

| De-esterification treatment    | Type of pectin detected                                                            |
|--------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| No treatment                   | - Acidic pectins : DE < 30-40%                                                     |
| PME<br>(pectin methylesterase) | - Acidic pectins : DE < 30-40%<br>- Methylesterified pectins : DE > 30-40 %        |
| NaOH                           | - Total pectin: Acidic<br>+ methylesterified<br>+ acetylerified<br>+ other esters) |

**Table 1:** type of pectin detected in function of the de-esterification treatment applied. DE: degree of esterification.

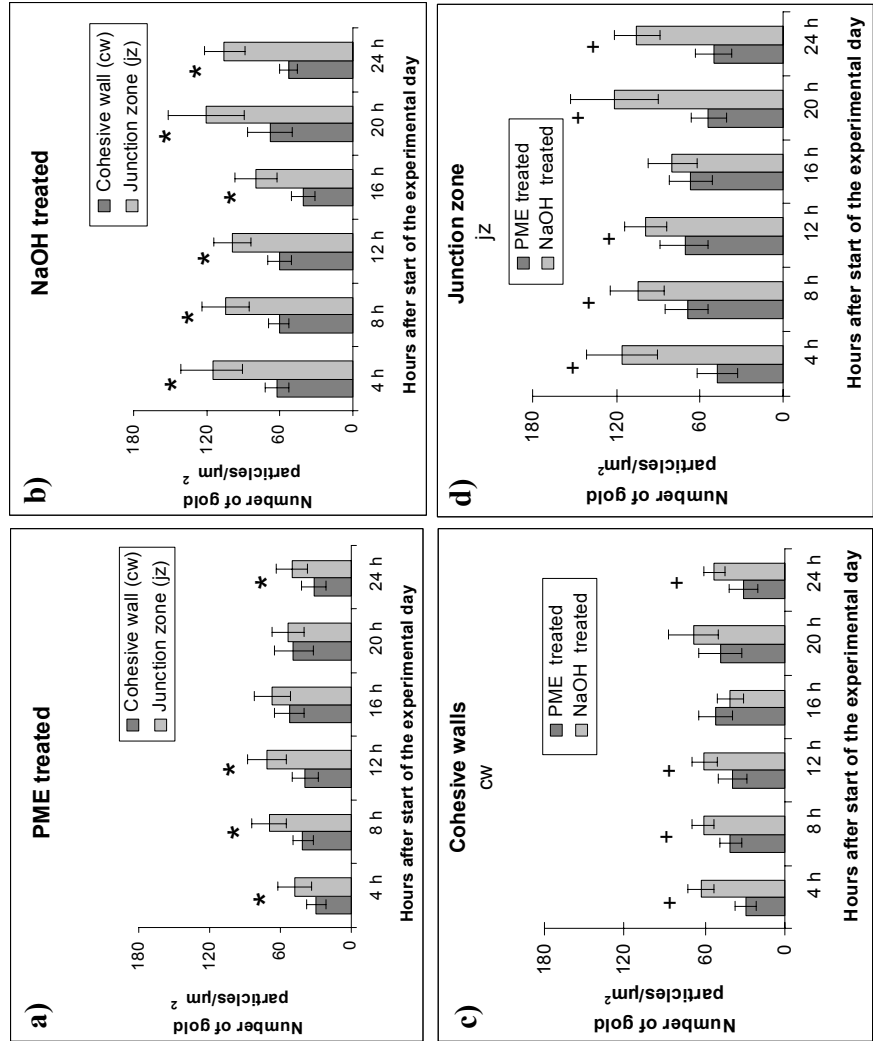
Pectin is indeed synthesized and secreted in a highly esterified form (methyl-, acetyl- and other esters) (Kauss & Hassid, 1967; Liners *et al.*, 1994) and these esterified pectin molecules present in young meristematic cell walls cannot adopt the supramolecular conformation recognized by the 2F4 antibody.

The electron microscopy grids were therefore de-esterified *in situ* using either PME to remove methyl groups or NaOH to remove methyl-, acetyl- and other esters (Table 1). These treatments allowed the binding of the antibody to the cell wall surface. The pH and temperature conditions of the NaOH de-esterification were chosen to minimize competitive  $\beta$ -

elimination of pectin (Liners *et al.*, 1994). Binding was measured by counting the number of gold particles per unit of wall area as described in Material and Methods.

Four parameters could explain the observed results: (a) the induction of flowering by a LD, (b) the time after start of the LD (or “sampling time”), (c) the type of de-esterification treatment (PME or NaOH) and (d) the wall area observed (cw or jz).

On Fig. 29, comparisons were made between labeling averages obtained in cohesive walls vs. junction zones of vegetative plants after PME or NaOH treatment (\* indicates significant statistical difference), and in



**Figure 29:** pectin labeling in walls of vegetative *Sinapis* SAM sections at six sampling times, as determined by quantification of the monoclonal antibody 2F4 labeling. Labeling density was determined separately for cohesive walls (cw) and junction zones (jz) and for PME- and NaOH-de-esterified sections. Error bars represent confidence interval at the 5 % level of significance ( $n=18-36$ ). (+, \*) indicate significant statistical difference as assessed by the Student's *t* test (or Mann-Whitney Rank Sum test). Comparisons made between averages obtained for a sampling point in (\*) cw or jz of vegetative plants, after PME (a) or NaOH (b) treatment, and in (+) vegetative plants de-esterified by PME or NaOH treatment, for cw (c) or jz (d).

cw and jz of vegetative plants de-esterified by PME vs. NaOH treatment (+ indicates significant statistical difference).

If we compare the wall area observed in these vegetative apices, we can see that vegetative jz generally had higher pectin labeling than the similarly treated vegetative cw (Fig. 29 a, b - \*) whichever de-esterification treatment applied. This means that in the SAM, the jz already had a wall composition different from the one of cw.

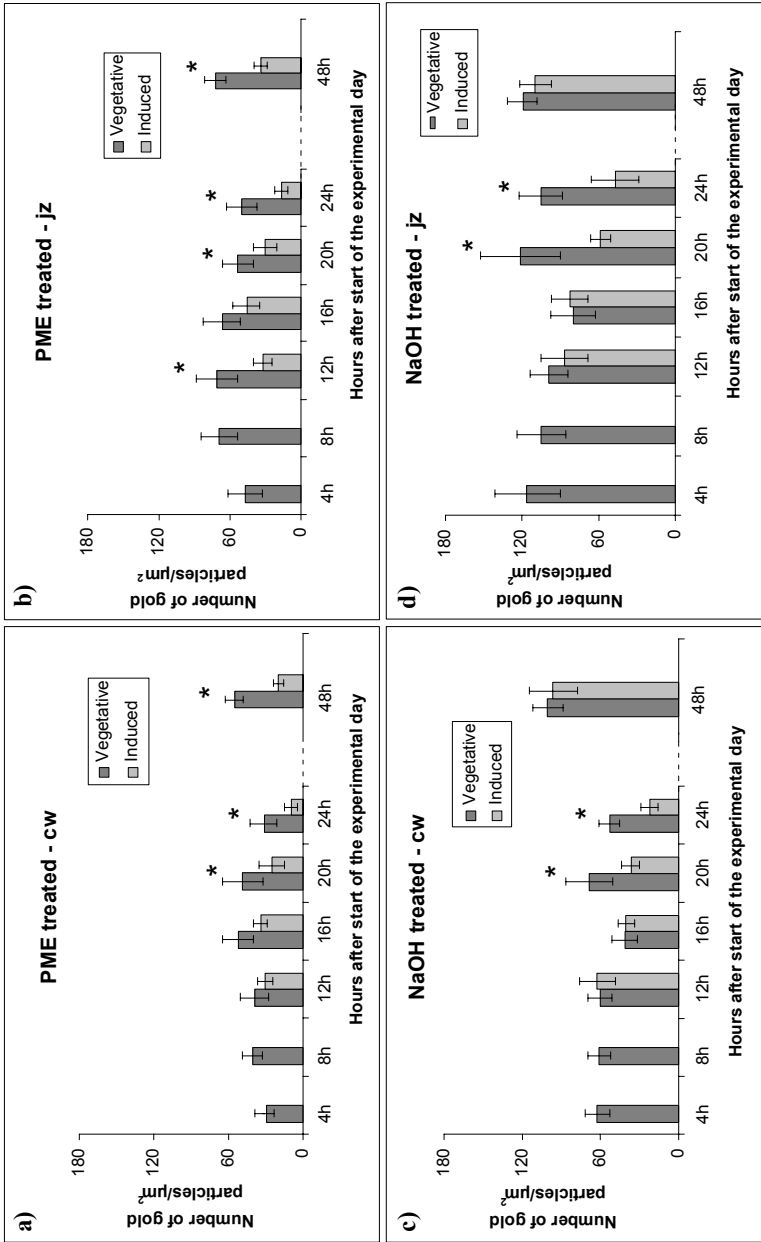
The differences frequently seen between labeling densities of enzymatic and chemically de-esterified vegetative samples (Fig. 29 c, d - +) also show that the meristem's pectin fraction is not only composed of methylesterified pectins but also of pectins esterified by acetyl groups or other esters. This was already observed in SAMs of *Sinapis* (Sobry *et al.*, in press) but labeling intensity differences are for the first time quantified here.

On Fig. 30, comparisons were made between labeling averages

obtained for short-day (SD) vegetative and long-day (LD) induced plants (\* indicate significant statistical difference).

The histograms clearly show that, at h 20 and 24 after the beginning of the experimental day, the walls of induced SAMs were much less labeled than the vegetative (control) apices, whichever de-esterification treatment applied or the wall area observed, and this decrease could also begin sooner, at h 12 as seen for pectin detected after PME treatment in the jz (Fig. 30 b). This dramatic reduction of the labeling in induced apices is clearly visible on histograms presenting the ratio of labeling density in induced to vegetative SAMs (Fig. 31) (\* indicate statistical significant difference between averages in vegetative and induced plants for a sampling time).

The pectin content thus decreased as soon as twelve hours after start of the LD at least for pectin detected in jz after PME treatment, and indisputably for h 20 and 24 on all histograms. Modification of pectin composition often start



**Figure 30:** pectin labeling in walls of vegetative and induced *Sinapis* SAM sections at seven sampling times, as determined by quantification of the monoclonal antibody 2F4 labeling. Labeling density was determined separately for (a, c) cohesive walls (cw) and (b, d) junction zones (jz), and for (a, b) PME- and (c, d) NaOH-de-esterified sections. Error bars represent confidence interval at the 5 % level of significance ( $n=18-36$ ). (\*) indicate significant statistical difference as assessed by the Student's *t* test (or Mann-Withney Rank Sum test).



earlier at cell corners (jz) during tissue differentiation (Guglielmino *et al.*, 1997; Bush *et al.*, 2001; Willats *et al.*, 2001a,b). The micrographs presented in Fig. 32 clearly show the labeling reduction observed at h 24 in an induced apex compared with a vegetative one.

At h 48, levels of pectin detected after PME treatment in cohesive walls and junction zones were also significantly smaller in induced than in vegetative plants (Fig. 30 a, b). This is even clearer on Fig. 31 a and b, as shown by the lower induced to vegetative ratio.

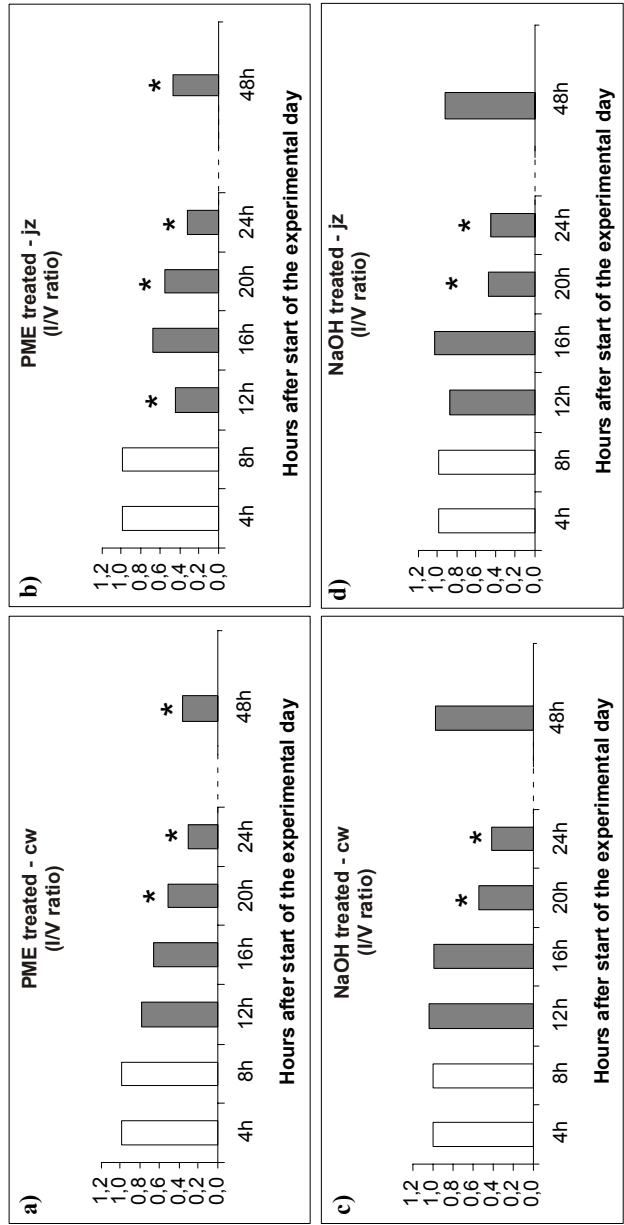
In contrast, these divergences were not seen after NaOH treatment (Fig. 30 c, d; Fig. 31 c, d). It means that the total pectin content in induced apices at h 48 (detected after complete de-esterification by sodium hydroxide) had returned to the level of vegetative samples while methylesterified pectin (detected after PME treatment) remained lower. The pectins newly synthesized in induced plants were thus mostly

esterified by other groups than methyl esters.

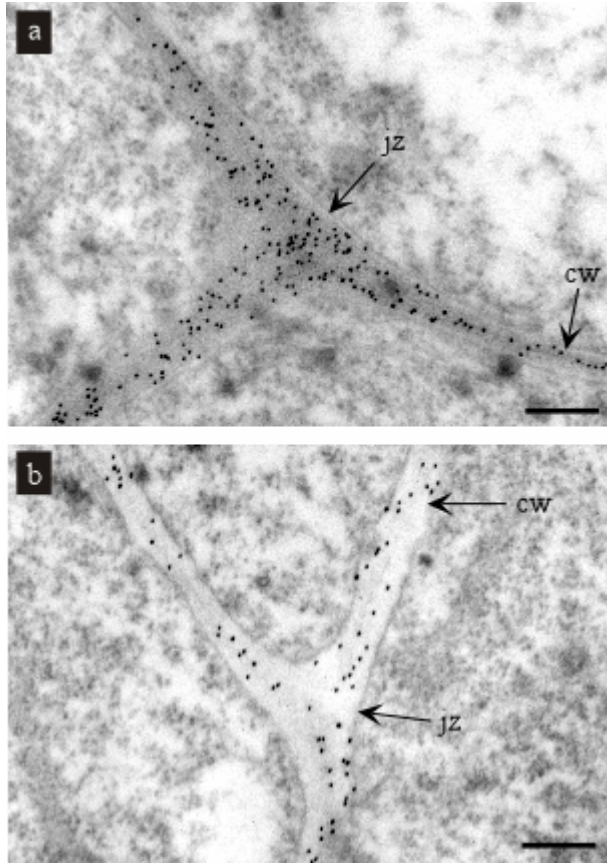
The experiment was repeated. Results obtained were very similar except that the decrease begun about 4 h earlier, from h 12 to 20 after start of the LD, the labeling being returned to the level of the corresponding vegetative control at 24 h (data not shown). Despite a higher number of repeats, variability in the timing of pectin decrease persisted in the second experiment. As in experience 1, fluctuations in the pectin content of vegetative apices were also observed along the day (data not shown), but no diurnal rhythm could be detected in the pectin content of vegetative apices.

## Discussion

The nearly complete absence of 2F4 labeling on SAM and its presence on de-esterified sections indicates that methyl- and/or acetyl- esters and other esters prevented the calcium-induced dimerization of the pectin chains and their recognition by the antibodies. This is in agreement with the observations that pectins are



**Figure 31:** induced to vegetative ratio (I/V) of pectin labeling in *Sinapis* SAM sections at seven sampling times during floral transition as determined by quantification of the monoclonal antibody 2F4 labeling. Plants that will remain vegetative and plants going to be induced are still indistinguishable at time-points 4 and 8 h since long days start when daylength exceeds 8 h. Data points at h 4 and 8 are thus “ghost” ratios and are represented as empty bars of value 1. Labeling density was determined separately for (a, c) cohesive walls (cw) and (b, d) junction zones (jz), and for (a, b) PME- and (c, d) NaOH-de-esterified sections. (\*) indicate significant statistical difference as assessed by the Student's *t* test (or Mann-Whitney Rank Sum test) between vegetative short-day (SD) and induced long-day (LD) plants and directly reported on the graphs.



**Figure 32:** pectin labeling observed in a jz and adjacent cw in *Sinapis* SAMs collected at 24 h after start of the experimental day. (a) Vegetative SAM from a SD-grown plant, (b) SAM from a LD-induced plant. Labeling observed with 2F4 antibody after NaOH de-esterification treatment. G: golgi. Bar = 500 nm.

synthesized and secreted as highly esterified molecules (Liners *et al.*, 1994). When meristem derived tissues differentiate below plant apices, they contain an increasing amount of acidic pectins that are readily labeled by the 2F4 antibodies (Bush *et al.*, 2001; Sobry *et al.*, in press): pectin esterase activity is correlated

with tissue differentiation (Alexandre *et al.*, 1997).

The presence of acetyl groups in addition to methyl esters on pectin molecules is supported by the observation of higher antibody labeling on chemically vs. enzymatically de-esterified apices. Although NaOH de-esterifies pectin completely, which is never achieved by

PMEs even in solution, it can not explain that the labeling of induced apices after PME treatment decreased to a very low level at h 48 as compared to the vegetative controls (Fig. 30 a and b) and to the chemically de-esterified sections (Fig. 30 c and d). A lower accessibility of the PME enzymes to pectins embedded in the resin was probably neither the cause of the differential labeling since IgG antibodies are several times larger than PMEs and it is generally considered that immunolabeling takes place on the surface of the sections.

The comparison of cw and jz shows differences in their wall composition, junction zones having higher pectin content. These differences were already observed in sugar-beet calli where 2F4 antibodies bound frequently to jz whereas they were largely absent from cw unless a previous de-esterification of the pectins was performed (Liners *et al.*, 1994). In the present case meristematic cells have no or little vacuoles and do probably not experience any large turgor pressure.

Mechanical constraints on junction zones must then be low and a higher content of esterified pectin in these cell corners could rather create a micro-environment more favorable to later cell separation.

In the meristems of plants induced by one LD, there was a marked but transient decrease in the homopolygalacturonic content of the cell wall between h 20 and 24 after start of the LD. This can only mean that pectolytic enzymes were secreted in the meristem in response to the arrival of the floral stimulus, resulting in a net decrease of the homopolygalacturonic content of the wall. It is highly improbable that the observed decrease of the labeling would only result from the massive apposition of new wall material more or less devoid of pectins. The changes must indeed have occurred between the start of the photoextension (from h 8 after start of the LD) and the sampling time h 20 to 24 after start of the LD). If these polysaccharides had been newly synthesized, they should have

been preceded by a significant increase in the number of Golgi vesicles in the induced meristems. Such an increase is only observed much later (Havelange *et al.*, 1974). We can also rule out the effect of cell division because the first peak of mitosis triggered by the floral stimulus also occurs later, at h 24-28 after start of the LD (Jacqmard *et al.*, 1998). Anyway, the mitotic index of induced *S. alba* meristems at h 24 is only 2.5 % and we did not include dividing cells in our observations.

Alternatively, these observations suggest that wall pectins were internalized and degraded in vacuoles. This is however highly improbable since no degraded pectins could be labeled in the vacuoles of the meristems.

The variability of the observations might be attributed to at least two factors.

First, we studied a population in which each individual responded more or less rapidly to floral induction. A great synchronicity is still observed for early modifications of floral transition

in the meristem of *S. alba* populations even if a 4 h time-lag between events of this floral transition is frequently observed between two successive analyses (Bernier, 1989).

Second, electron microscopy did not allow us to distinguish between different domains within the meristem (Fig. 27 b), with the exception of epidermal cell walls of the clearly recognizable L1 layer that were not included in the labeling measurements. This could be worrying if fluctuations in pectin content of vegetative or induced SAM were restricted to specific areas in the meristems. Indeed, changes of SaMADS A expression in *Sinapis* (Menzel *et al.*, 1996) or FPF1 expression in *Sinapis* and *Arabidopsis* (Kania *et al.*, 1997) observed at flowering time were shown to concern only restricted areas of the apex. In another organ, Dolan *et al.* (1997) similarly showed that dividing and non-dividing cells of the *Arabidopsis* root apex differed in their esterification degree of wall pectin. However, despite possible zone to zone variations,

pectin degradation was clearly linked to floral induction in all samples we could observe.

Modulation of pectin structure within the cell wall reflects progressive changes during cell development. The pectic network influences the pH and ionic status of the matrix and, through its capacity to form gels, is also intimately involved in the generation of mechanical and porosity properties of cell walls. These properties in turn are likely to modulate cell wall cohesion and hydration and influence the movement and access of cell-wall modifying proteins to the matrix (Willats *et al.*, 2001a).

The decrease in pectin content might be involved in other changes linked to cell differentiation like the increase in exchanges between meristematic cells (Ormrod & Bernier, 1990; Bradley *et al.*, 1996). In *Sinapis*, it was shown that the frequency of plasmodesmata increases in SAM cell walls between h 28 and h 48 after start of the LD and that the extra plasmodesmata are essentially

formed in existing walls (Ormenese *et al.*, 2000). Moreover, the superficial central symplasmic field within the SAM undergoes radial alterations in size and shape starting at h 24-32 after beginning of the inductive LD (Ormenese *et al.*, 2002). The decrease in the pectin content of the transitional SAM thus precedes the subsequent remodeling of the plasmodesmata pattern.

The pectolytic enzymes must have released pectin fragments in induced meristem cell walls from h 20 to 24 after start of the LD. The persistence and fate of these degraded pectins are unknown. Pectin fragments are detected in ricin phloem (Rigby *et al.*, 1994) and squash xylem (Iwai *et al.*, 2003) saps, which suggests that pectin fragments could act as long-distance signals in the whole plant. Marfà *et al.* (1991) showed that oligogalacturonides induce flower formation on tobacco thin cell layers. Oligogalacturonides also trigger a signal transduction cascade (Messiaen *et al.*, 1993; Messiaen

& Van Cutsem, 1994; Ridley *et al.*, 2001) and this signal can be modulated by polyamines such as putrescine that stabilizes egg-boxes and thereby increases the signal (Messiaen *et al.*, 1997; Messiaen & Van Cutsem, 1999). Putrescine leaves *S. alba* mature leaves between h 9 to 15 after start of the LD (Havelange *et al.*, 1996) along with the floral stimulus. The concentration of calcium ions that induce the egg-box conformation of pectin also increases during floral transition in the *S. alba* meristems (Havelange & Bernier, 1993).

The *in planta* role of oligogalacturonides in floral induction was first shown in *Rudbeckia bicolor* (LD plant) and *Perilla nankinensis* (SD plant) (Milyaeva & Nikiforova, 1996; Nikiforova *et al.*, 1999). These authors propose a scheme of signal transduction that includes photoperiodic signals originating from leaves and positional signals in the cells of stem apices. Oligogalacturonides play a role in the appearance of the latter and they might serve as link in the chain

of signal transduction from floral induction to floral organogenesis.

Changes in positional information given by the cell wall influence cell fate, as shown by Berger *et al.* (1994) on zygotes of the alga *Fucus spiralis*, and by Scheres (2001). It has recently been shown that pectic fragments under the egg-box conformation recognized by the 2F4 antibody bind an external 187aa-long peptide of the *A. thaliana* wall associated kinase WAK1 expressed as a soluble recombinant peptide in yeast (Decreux & Messiaen, in press). These pectic fragments could modulate the reported signaling role of WAK1 during cell differentiation (Wagner & Kohorn, 2001).

Our results can be considered as new indications of a possible role of pectolytic enzymes and pectic fragments in the transition to flowering. Confirmation of this role will need proof of the secretion of these enzymes in the induced SAM, of the release of pectic fragments and of the actual triggering of a signal transduction cascade.

Our results also show that newly synthesized pectins detected in the induced SAM at h 48 after start of the LD are mostly composed of pectin esterified by acetyl groups and other esters than methylesters. A related result was obtained in friable sugar-beet calli (Liners *et al.*, 1994) where pectin was only detected after chemical de-esterification that removes the predominant acetyl-esters. In contrast to these calli, the 48 h induced SAM is not friable but looks slightly desiccated when observed with binocular lens (unpublished observation). The increase in pectin esterification by acetyl groups could perhaps modify the hydration of the meristem but this also needs further investigation.

## Conclusion

The SAM of *Sinapis alba* is submitted to extensive modifications of its homogalacturonan content and composition in the course of early events of the floral transition. This could be a prerequisite to the necessary adjustments of the cell wall for the subsequent changes that take

place during development and for the reorganization of cellular exchanges allowing communication and coordination between cells and different meristematic areas. This work is in line with the increasing amount of data suggesting that pectic polysaccharides have multiple functions in plant growth and development, and that the *in muro* de-methyl-esterification of homogalacturonan by pectin methylesterases is a key process for the local modulation of cell wall properties.

---

## Acknowledgments

Many thanks are due to Mrs. Ch. Devignon (Unité interfacultaire de microscopie électronique, FUNDP, Namur, Belgium) and C. Demazy for excellent technical assistance, and to G. Bernier for helpful discussions and critical reading of the manuscript. The work reported here was supported by grants from FRIA (Fonds pour la Recherche scientifique dans l'Industrie et l'Agriculture) to S. Sobry and FRFC (Fonds de la Recherche Fondamentale et Collective – 2.4530.93). Thanks also to



Blackwell Publishing for having accepted publication on-line.

## References

**Alexandre F, Morvan O, Gaffé J, Marek A, Jauneau A, Dauchel H, Balangé A, Morvan C** (1997) Pectin methylesterase pattern in flax seedlings during their development. *Plant Physiol Biochem* 35(6): 427-436

**Berger F, Taylor A, Brownlee C** (1994) Cell fate determination by the cell wall in early fucus development. *Science* 263: 1421-1423

**Bernier G** (1988) The control of floral evocation and morphogenesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 39: 175-219

**Bernier, G** (1989) Events of the Floral Transition of Meristems. In: Lord E, Bernier G (eds) *Plant Reproduction: from Floral Induction to Pollination*. American Society of Plant Physiologists Series, vol. I, Rockville, Maryland, 42-50

**Bradley D, Carpenter R, Copsey L, Vincent C, Rothstein S, Coen ES** (1996) Control of inflorescence architecture in *Antirrhinum*. *Nature*, 379: 791-797

**Bush MS, Marry M, Huxham IM, Jarvis MC, McCann MC** (2001) Developmental regulation of pectic epitopes during potato tuberisation. *Planta* 213: 869-880

**Cilia ML, Jackson D** (2004) Plasmodesmata form and function. *Curr Op Cell Biol*, 16: 500-506

**Decreux A, Messiaen J** (2005) Wall-associated kinase WAK1 interacts with cell wall pectins in a calcium-induced conformation. *Plant Cell Physiol* 46(2), in press

**Ding B, Lucas WJ** (1996) Secondary plasmodesmata: Biogenesis, Special Functions, and Evolution. In: Smallwood M, Knox P, Bowles D (eds) *Membranes: Specialized Functions in Plants*. BIOS Scientific Publishers Inc., Oxford, pp 489-506

**Dolan L, Linstead P, Roberts K** (1997) Developmental regulation of pectic polysaccharides in the root meristem of *Arabidopsis*. *J of Exp. Botany* 48(308): 713-720

**Grant GT, Morris ER, Rees DA, Smith PJC, Thom D** (1973) Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model. *FEBS Letters* 32(1): 195-198

- Guglielmino N, Liberman M, Jauneau A, Vian B, Catesson AM, Goldberg R** (1997) Pectin immunolocalization and calcium visualization in differentiating derivatives from poplar cambium. *Protoplasma* 199: 151-160
- Havelange A, Bernier G** (1974) Descriptive and quantitative study of ultrastructural changes in the apical meristem of mustard in transition to flowering. I. The cytoplasm, mitochondria and protoplasmids. *J Cell Sci* 16: 421-432
- Havelange A, Bernier G** (1993) Cation fluxes in the sap of *Sinapis alba* during floral transition. *Physiol Plant* 87: 353-358.
- Havelange A, Lejeune P, Bernier G, Kaur-Sawhney R, Galston AW** (1996) Putrescine export from leaves in relation to floral transition in *Sinapis alba*. *Physiol Plant* 96: 59-65
- Iwai H, Usui M, Hoshino H, Kamada H, Matsunaga T, Kakegawa K, Ishii T, Satoh S** (2003) Analysis of sugars in squash xylem sap. *Plant Cell Physiol*, 44(6): 582-587
- Jacqumard A, Houssa C, Bernier G** (1998) Control of the Cell Division Cycle Changes in the Shoot Meristem of *Sinapis alba* During the Transition to Flowering. In: Bryant JA, Chiatante D (eds) *Plant Cell Proliferation and its Regulation in Growth and Development*. Wiley, New York: 67-78
- Kania T, Russenberger D, Peng S, Apel K, Melzer S** (1997) FPF1 promotes flowering in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 9: 1327-1338
- Kauss H, Hassid WZ** (1967) Enzymic Introduction of the Methyl Ester Groups of Pectin. *J Biol Chem* 242: 3449-3453
- Kollmann R, Glockmann C** (1991) Studies on graft unions. III. On the mechanism of secondary formation of plasmodesmata at graft interface. *Protoplasma* 165: 71-85
- Lejeune P, Kinet J-M, Bernier G** (1988) Cytokinin fluxes during floral induction in the long day plant *Sinapis alba* L. *Plant Physiol* 86: 1095-1098
- Liners F, Gaspar T, Van Cutsem P** (1994) Acetyl- and methyl-esterification of pectins of friable

and compact sugar-beet calli: consequences for intercellular adhesion. *Planta* 192: 545-556

**Liners F, Letesson J-J, Didembourg C, Van Cutsem P** (1989) Monoclonal antibodies against pectin. *Plant Physiol* 91: 1419-1424

**Liners F, Thibault J-F, Van Cutsem P** (1992) Influence of the degree of polymerization of oligogalacturonates and of esterification pattern of pectin on their recognition by monoclonal antibodies. *Plant Physiol* 99: 1099-1104

**Liners F, Van Cutsem P** (1992) Distribution of pectic polysaccharides throughout walls of suspension-cultured carrot cells, an immunocytochemical study. *Protoplasma* 170: 10-21

**Lucas WJ, Ding B, van der Schoot C** (1993) Plasmodesmata and the supracellular nature of plants. *New Phytol* 125: 435-476

**Lyndon RF** (1998) The shoot apical meristem: its growth and development. Cambridge Univ Press, Cambridge

**Marfà V, Gollin D, Eberhard S, Mohnen D, Darvill A, Albersheim**

**P** (1991) Oligogalacturonides are able to induce flowers to form on tobacco explants. *The Plant Journal* 1(2): 217-225

**Menzel G, Apel K, Melzer S** (1996) Identification of two MADS box genes that are expressed in the apical meristem of the long-day plant *Sinapis alba* in transition to flowering. *Plant J* 9: 399-408

**Messiaen J, Cambier P, Van Cutsem P** (1997) Polyamines and pectins. I - Ion exchange and selectivity. *Plant Physiol* 113: 387-395

**Messiaen J, Read ND, Van Cutsem P, Trewavas AJ** (1993) Cell wall oligogalacturonides increase cytosolic free calcium in carrot protoplasts. *J Cell Science* 104: 365-371

**Messiaen J, Van Cutsem P** (1994) Pectic signal transduction in carrot cells: membrane, cytosolic and nuclear responses induced by oligogalacturonides. *Plant Cell Physiol* 35(4): 677-689

**Messiaen J, Van Cutsem P** (1999) Polyamines and pectins. II. Modulation of pectic-signal transduction. *Planta* 208: 247-256

**Milyaeva E, Nikiforova V** (1996) Informational signaling in stem apical meristems of plants during transition to flowering. *FNL* 22: 26-33

**Mouradov A, Cremer F, Coupland G** (2002) Control of flowering time: interacting pathways as a basis for diversity. *The Plant Cell* 14: S111-S130

**Nikiforova VY, Sidorkina EV, Milyaeva EL** (1999) The control of plant transition to flowering by cell-wall active compounds. *Russ J of Plant Physiol* 46(5): 661-665

**Ormenese S, Havelange A, Bernier G, Van der Schoot C** (2002) The shoot apical meristem of *Sinapis alba* L. expands its central symplasmic field during the floral transition. *Planta* 215: 67-78

**Ormenese S, Havelange A, Deltour R, Bernier G** (2000) The frequency of plasmodesmata increases early in the whole shoot apical meristem of *Sinapis alba* L. during floral transition. *Planta* 211: 370-375

**Ormrod JC, Bernier G** (1990) Cell cycle patterns in the shoot apex of *Lolium temulentum* L. cv. Ceres during the transition to flowering

following a single long-day. *J Exp Bot*, 41: 211-216

**Périlleux C, Bernier G** (2002) The control of flowering: do genetical and physiological approaches converge? In: O'Neill SD, Roberts JA (eds) *Plant Reproduction, Annual Plant Reviews*, Vol. 6. Sheffield Academic Press, Sheffield, pp. 1-32

**Ridley BL, O'Neill MA, Mohnen D** (2001) Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonides-related signaling. *Phytochemistry* 57: 929-967

**Rigby NM, MacDougall AJ, Needs PW, Selvendran RR** (1994) Phloem translocation of a reduced oligogalacturonide in *Ricinus communis* L. *Planta* 193: 536-541

**Scheres B** (2001) Plant cell identity. The role of position and lineage. *Plant Physiol* 125: 112-114

**Sobry S, Havelange A, Van Cutsem P** (2005) Immunocytochemistry of pectins in shoot meristems. Consequences for intercellular adhesion. *Protoplasma*, in press

**Sussex IM** (1989) Developmental programming of the shoot meristem. *Cell* 56: 225-229

**Vreeland V, Morse SR, Robichaux RH, Miller KL, Hua ST, Laetsch WM** (1989) Pectate distribution and esterification in *Dubautia* leaves and soybean nodules, studied with a fluorescent hybridization probe. *Planta* 177: 435-446

**Wagner TA, Kohorn BD** (2001) Wall-associated kinases are expressed throughout plant development and are required for cell expansion. *Plant Cell* 13: 303-318

**Willats WGT, Gilmartin PM, Mikkelsen JD, Knox JP** (1999) Cell wall antibodies without immunization: generation and use of de-esterified homogalacturonan block-specific antibodies from a naive phage display library. *The Plant J* 18(1): 57-65

**Willats WGT, McCartney L, Knox JP** (2001b) *In-situ* analysis of pectic polysaccharides in seed mucilage and at the root surface of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 213: 37-44

**Willats WGT, Orfila C, Limberg G, Buchholt HC, van Alebeek G-J, Voragen AGJ, Marcus SE, Christensen TMIE, Mikkelsen JD, Murray BS, Knox JP** (2001a) Modulation of the degree and pattern of methyl-esterification of pectic homogalacturonan in plant cell walls. *J Biol Chem*, 276 (22): 19404-19413

**Willats WGT, Steele-King CG, McCartney L, Orfila C, Marcus SE, Knox JP** (2000) Making and using antibody probes to study plant cell walls. *Plant Physiol Biochem* 38(1/2): 27-36



## ■ Comparaison des différentes zones de l'apex

Afin de pouvoir comparer les modifications des teneurs en pectine, observées au cours de la transition florale, entre les différentes zones du méristème, nous avons complété la microscopie électronique par l'analyse d'objets en microscopie optique. La technique utilisée est celle de l'intensification à l'argent, exposée dans le premier article présenté (Sobry *et al.*, Protoplasma, sous presse). La méthode de fixation est dérivée de celle décrite par Christensen *et al.* (1998) pour la détection immunocytochimique des PME chez l'orange, en vue de l'utilisation des mêmes échantillons pour le marquage avec notre polysérum dirigé contre les PME.

### Méthode d'analyse des images

- L'analyse des pectines en microscopie confocale apporte d'autres types d'informations que la microscopie électronique.

En effet, nous n'avons pu mettre en évidence aucune diminution significative du marquage chez les induits par rapport aux végétatifs comme on l'espérait sur base des résultats obtenus en microscopie électronique (résultats non présentés). Nous attribuons cette observation à deux facteurs :

- Contrairement à la microscopie électronique que l'on peut qualifier de semi-quantitative, ***la technique de l'intensification à l'argent n'est pas quantitative.*** L'étape supplémentaire que représente l'intensification à l'argent a l'avantage de pouvoir rendre visible de façon précise des marquages de faible intensité, mais a comme désavantage le fait qu'elle va niveler de plus faibles variations d'intensité de ces signaux.
- ***Cette étape est sensible à de nombreux paramètres*** (température ambiante, qualité de l'eau purifiée par le système d'osmose inverse – Millipore, résistivité  $\approx 18 \text{ M}\Omega.\text{cm}^{-1}$ , traces d'ions métalliques...). Malgré un contrôle strict, il s'est avéré impossible d'éviter les

variations dans l'intensité du signal obtenu d'une coupe à une autre. Cependant, le but de cette analyse en microscopie optique étant de comparer les intensités de marquage d'une zone du méristème à une autre au sein d'un même objet (localisation différentielle), et non d'une coupe à une autre, ces variations de l'intensité du signal ne sont que peu gênantes. L'établissement de rapports entre les intensités de marquage d'une zone à une autre de l'apex sur une même coupe, permet d'obtenir des valeurs que l'on peut comparer pour les différents temps de prélèvements et pour les différentes conditions (végétatif ou induit).

- Nous avons donc développé une méthode d'analyse des images utilisant le programme de quantification associé au microscope confocal (Confocal Assistant 4.02).

## ● Détermination des zones à comparer

Les régions à comparer dans l'apex ont été déterminées en fonction des divers types de zonations existant au sein du méristème apical. Ces dernières ont été décrites en détail dans le « Relevé de la littérature » (p54).

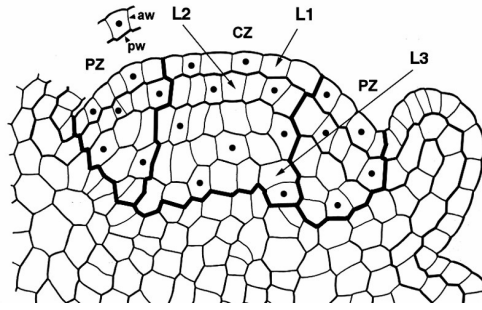
### - **A l'intérieur de la zone méristématique – ZM**

(cellules non vacuolisées – divisions cellulaires fréquentes) :

Comparaison (Figure 33) des intensités de marquage des couches cellulaires L1 et L2 par rapport à celles de la zone L3+M (troisième couche cellulaire et cellules méristématiques sous-jacentes – nommées méristème médullaire sur la Fig. 18).

Comparaison des intensités de marquage des zones périphériques (ZP) de l'apex (donnant naissance aux primordiums foliaires ou inflorescentiels) à celles de la zone centrale (ZC) (Figure 33).

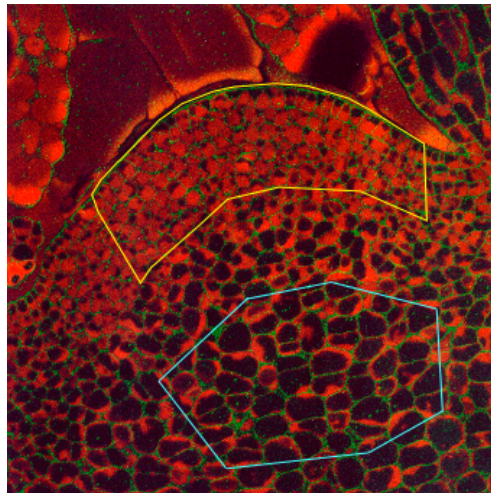




**Figure 33** : différentes zones du méristème (couches L1, L2, d'une seule assise cellulaire chacune ; couche L3 ; PZ : peripheral zones ; CZ : central zone). Aw : anticlinal wall ; pw : periclinial wall. Repris de Ormenese et al., 2000.

### - Entre zone méristématique et non méristématique – ZM et ZNM:

Comparaison de l'intensité du signal entre les zones méristématique – ZM (cellules non vacuolisées) et non méristématique – ZNM (cellules vacuolisées – divisions cellulaires moins fréquentes) (Figure 34).



**Figure 34**: délimitation des zones méristématique (ZM – jaune) et non méristématique (ZNM – bleu) – coupe désestérifiée à la PME.

Pour les **coupes désestérifiées à la PME**, nous ne comparons que les intensités de marquage des ZM et ZNM. En effet, sur ces coupes, l'intensité du signal est telle qu'il n'est pas possible de mettre en évidence de différences au sein de la zone méristématique (en raison du nivellement que l'on observe pour de faibles variations dans l'intensité du signal obtenu par la technique d'intensification à l'argent). Les variations semblent par contre beaucoup plus importantes entre les ZM et ZNM et on peut donc espérer les mettre en évidence.

Pour les **coupes non désestérifiées**, montrant un signal extrêmement faible qui permet des comparaisons de type présence/absence de marquage plutôt que la comparaison de faibles variations d'intensité du signal, les mesures sont effectuées entre la ZM et la ZNM, ainsi qu'au sein de la ZM.

Nous avons développé la méthode de mesure des intensités de marquage en utilisant le programme de quantification associé au microscope confocal (Confocal Assistant 4.02), ainsi que la méthode de traitement des données dans Excel. Cette méthode est décrite en annexe 2.

## Résultats

Les marquages ont été réalisés sur deux objets pour les 12<sup>ème</sup> et 16<sup>ème</sup> heures, et un objet pour les 20<sup>ème</sup>, 24<sup>ème</sup> et 48<sup>ème</sup> heures. S'agissant d'une localisation différentielle (rapport des intensités de marquage d'une zone à une autre sur une même coupe) et non de quantification moyenne sur plusieurs échantillons comme en microscopie électronique, l'analyse de quelques objets donne des résultats interprétables jusqu'à un certain point.

Les mesures de coefficients de surface de paroi - représentant un pourcentage de la surface sélectionnée, occupé par les parois (voir annexe 2) - ont ensuite été réalisées pour chaque type de zone sur des coupes marquées après désestérification à la PME. Les résultats sont portés en graphique pour chaque temps de prélèvement chez les végétatifs et les induits, et présentés ci-dessous (figure 35). Par la suite, nous avons

mesuré les intensités de marquage pour chaque type de zone, et effectué les comparaisons de zone à zone, comme décrit en annexe 2, sur chaque image. Toutes les statistiques ont été réalisées en utilisant le programme Sigma Stat (Jandel Scientific).

## ● Estimation de la surface des parois

On n'observe aucune différence quant à la valeur du coefficient de surface de parois attribué à chaque type de zone pour les échantillons végétatifs V12 à V48 entre eux (Fig. 35 a-e). On n'observe aucune différence non plus entre les induits au sein des prélèvements effectués à 12, 20 et 48 heures (Fig. 35 a, c, e).

Par contre on constate que les coefficients des ZM et  $ZM_{sl}$ <sup>18</sup> des I16 sont significativement différents de celui de la zone non méristématique ZNM (Test *t* de Student – indiqué par  $\Delta$  sur Fig. 35 b). Celui de la  $ZM_{sl}$  des I24 est également significativement différent de celui de la ZNM (Mann-Whitney Rank Sum Test<sup>19</sup> – indiqué par  $\Delta$  sur Fig. 35 d).

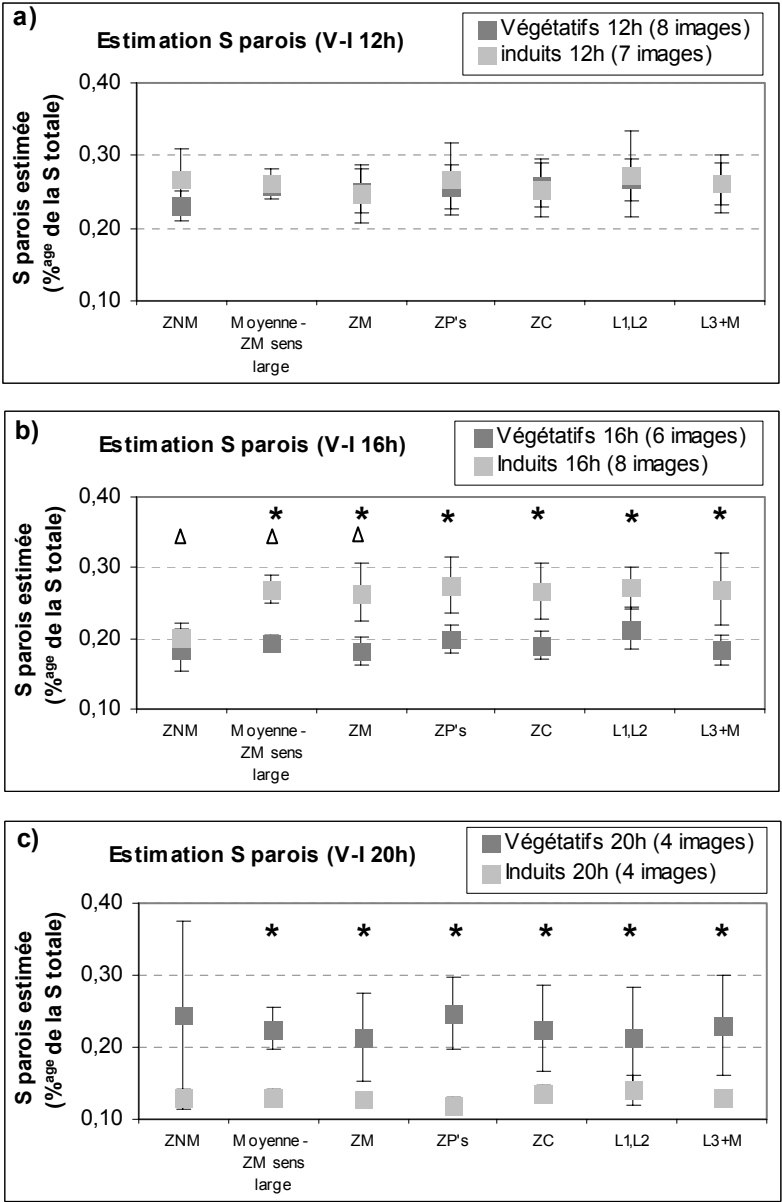
Le coefficient de surface de paroi estimée n'intervient donc dans les calculs des rapports des intensités de marquage de zone à zone que pour comparer la ZM et la ZNM des I16 et I24. Pour les autres, le coefficient étant identique d'une zone à une autre, il s'annule dans les calculs et n'intervient donc pas (voir annexe 2).

Si on compare les végétatifs et les induits entre eux on n'observe aucune différence dans le coefficient de  $S_{parois}$  estimé pour les 12<sup>ème</sup>, 24<sup>ème</sup> et 48<sup>ème</sup> heures (Fig. 35 a, d, e). Par contre à la 16<sup>ème</sup> heure, on constate que les Coef.  $S_{parois}$  des induits pour les ZM et ZM sens large sont significativement supérieurs à ceux des végétatifs pour les mêmes zones (Test *t* de Student<sup>20</sup> – indiqué par \* sur Fig. 35 b). Le coefficient de la ZNM est, lui, comparable pour les V et les I.

<sup>18</sup>  $ZM_{sl}$  (ZM sens large): toutes zones du méristème confondues.

<sup>19</sup> Ce test est effectué lorsque la variance des deux échantillons comparés n'est pas égale.

<sup>20</sup> Ou Mann Whitney Rank Sum Test.



**Figure 35 a, b, c:** graphiques des coefficients de surface de parois estimée (pourcentage en parois de la surface totale de la zone sélectionnée), pour chaque temps de prélèvement et chaque type de zone, chez les méristèmes végétatifs et les induits. (Moyenne ZM sens large = moyenne des mesures des ZM, ZP, ZC, L1,L2 et L3+M). Les barres d'erreur représentent l'intervalle de confiance à 95 %. \* indique une différence significative entre végétatifs et induits. Δ indique une différence significative entre induits.

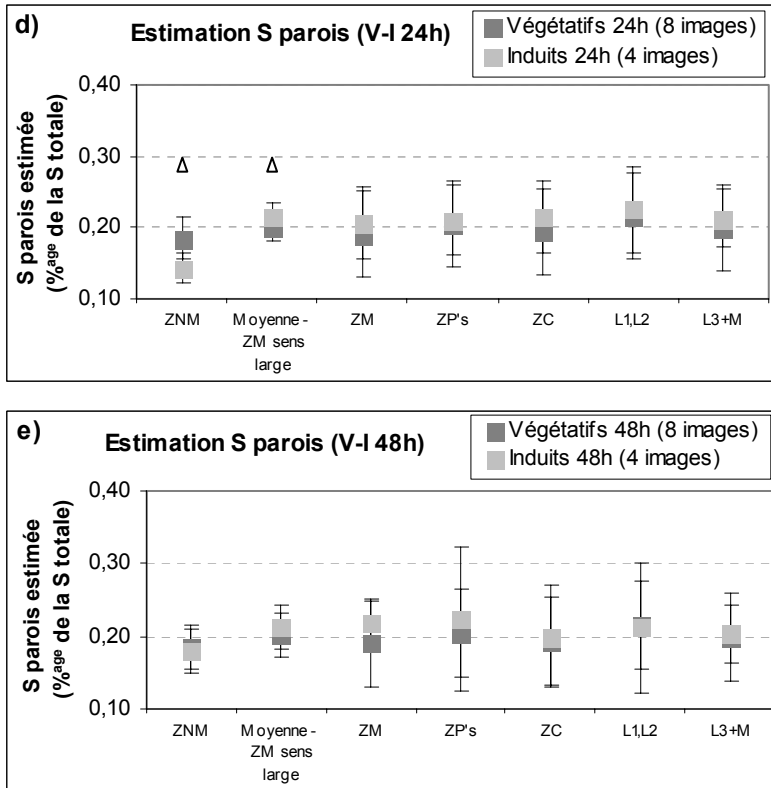


Figure 35 d, e

A la 20<sup>ème</sup> h après le début du JL, on ne constate pas de variation entre la ZM et la ZNM mais la  $S_{\text{parois}}$  estimée est significativement inférieure chez les induits par rapport aux végétatifs, sauf au niveau de la ZNM (Test  $t$  de Student – indiqué par \* sur Fig. 35 c).

Enfin, à la 24<sup>ème</sup> h, les cellules de la  $ZM_{sl}$  du méristème induit présentent de nouveau un Coef.  $S_{\text{parois}}$  estimé supérieur à celui de la ZNM (Test  $t$  de Student – indiqué par  $\Delta$  sur Fig. 35 d).

- Ces différences dans la surface des parois des végétatifs et des induits pourraient être liées à des variations de l'hydratation pariétale suite à l'induction florale.

A la 16<sup>ème</sup> h, la plus grande épaisseur des parois dans les méristèmes induits (Fig. 35 b) pourrait être liée à la dégradation

des pectines observée en microscopie électronique. Cette dégradation pourrait en effet favoriser un relâchement des liens dans la paroi permettant un gonflement de celle-ci par hydratation.

A la 20<sup>ème</sup> h, la réduction de l'épaisseur des parois dans les méristèmes induits (Fig. 35 c) pourrait être liée à leur déshydratation suite à un appel d'eau par les cellules méristématiques. En effet, chez *Sinapis*, l'induction florale est corrélée notamment à une augmentation des concentrations en saccharose au niveau du méristème apical dès la 10<sup>ème</sup> h (Lejeune *et al.*, 1993), qui pourrait favoriser la prise d'eau par les cellules en raison d'un accroissement de la pression osmotique. De plus, la taille des cellules augmente dès la 18<sup>ème</sup> h après le début du JL (Havelange & Bernier, 1974).

A la 24<sup>ème</sup> heure, l'absence de différences significatives entre végétatifs et induits (Fig. 35 d) pourrait indiquer un retour de l'épaisseur des parois vers des valeurs normales. Ceci pourrait résulter des divisions cellulaires rapides et synchrones se produisant de façon concomitante au sein de la zone méristématique (Jacqmard *et al.*, 1998) mais pas dans la zone non méristématique. Ce qui pourrait expliquer la différence significative observée entre ces deux zones dans les apex induits.

Cette interprétation et les conséquences qui en dérivent sont discutées plus loin.

## ● Comparaisons de zone à zone

Pour chaque comparaison effectuée, nous présentons le graphe de la moyenne des rapports calculés pour tous les objets analysés. Sur ces graphiques, les valeurs des V24 ont été dupliquées dans les V48 et inversement, car ils représentent en réalité deux objets différents d'un même temps de prélèvement. Ceci a également été effectué pour les graphes de l'estimation de la S des parois.

## □ Entre ZM et NM

### **Coupes non désestérifiées**

Chez les **végétatifs**, on constate que le rapport des intensités de marquage des zones méristématiques ZM et non méristématiques ZNM varie au cours du temps (Anova, One way analysis of Variance). Il est en général proche de 1, sauf à 16 h où il est significativement inférieur à 1 et différent de celui de la 12<sup>ème</sup> h (Tuckey Test – indiqué par  $\Delta$  sur Fig. 36 a). On observe en outre des différences significatives entre les végétatifs et les induits aux 12<sup>ème</sup> et 24<sup>ème</sup> heures (Test  $t$  de Student - indiqué par \* sur Fig. 36 a).

Chez les **induits**, le rapport ZM/ZNM varie également au cours du temps (Anova, One way analysis of Variance). Cependant, il est en général inférieur à 1, alors qu'à la 48<sup>ème</sup> heure, le rapport est significativement supérieur à 1 et différent de ceux mesurés pour les 12<sup>ème</sup>, 16<sup>ème</sup> et 24<sup>ème</sup> heures (Tuckey Test – indiqué par  $^\circ$  sur Fig. 36 a).

---

De la 12<sup>ème</sup> à la 24<sup>ème</sup> heure, il semble donc qu'il y ait plus de pectine acide dans la ZNM que dans la ZM chez les induits ( $ZM/ZNM < 1$  – Fig. 36 a). Ceci pourrait être le reflet de la dégradation des pectines acides ( $DE < 30-40\%$ ) dans la ZM, mais qui n'aurait pas eu lieu dans la ZNM.

---

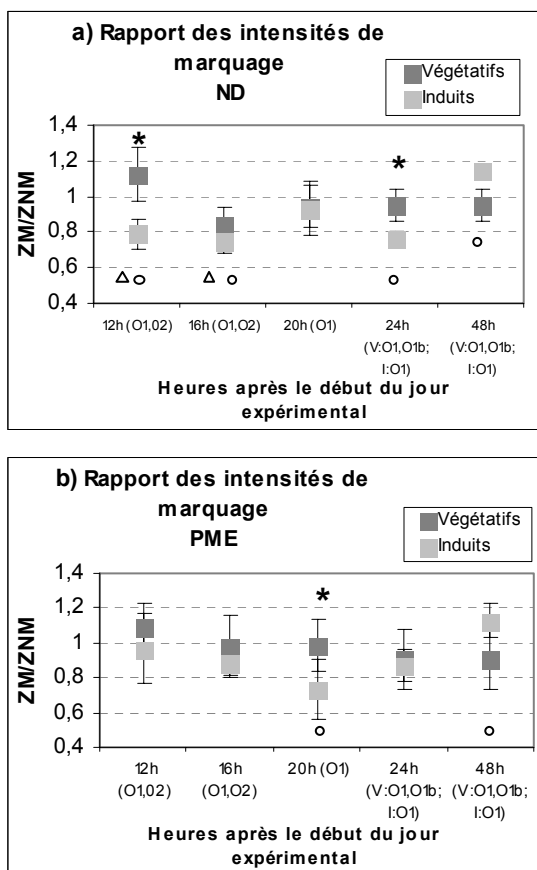
La dégradation des pectines acides et des pectines méthylestérifiées (mises en évidence après traitement à la PME) dans la zone méristématique a, elle, été avérée par la microscopie électronique, il n'est donc pas étonnant d'observer le même type de dégradation pour les pectines acides uniquement, même si celles-ci sont présentes en très faibles quantités.

---

A la 48<sup>ème</sup> heure, il semble donc qu'il y ait plus de pectine acide dans la ZM que dans la ZNM ( $ZM/ZNM > 1$  – Fig. 36 a). La pectine nouvellement déposée au sein de l'apex, et déjà désestérifiée, pourrait être responsable de cette augmentation du rapport.

---

Mais il n'existe pas de différences significatives entre végétatifs et induits.



**Figure 36 :** rapport des intensités de marquage de la ZM et de la ZNM dans des méristèmes végétatifs (V) et induits à fleurir (I) – coupes non désestérifiées (a) et désestérifiées à la PME (b). Les barres d'erreur représentent l'intervalle de confiance à 95 %. (\* indique une différence significative entre V et I), (o indique une différence significative entre induits : (a) I48>I12, I16 et I24, (b) I48>I20), (Δ indique une différence significative entre V12 et V16). O1 : objet 1 ; O2 : objet 2.

### Coupes désestérifiées à la PME

Chez les **végétatifs**, le rapport des intensités de marquage des ZM et ZNM ne varie pas significativement au cours du temps et est proche de 1 (Fig. 36 b). Il semble donc qu'il y ait autant de pectines acides et méthylestérifiées dans la ZM que la ZNM.



Chez les **induits**, le rapport ZM/ZNM varie au cours du temps (Anova, One way analysis of Variance) et présente un minimum à la 20<sup>ème</sup> heure. De plus, le test de Tuckey indique une différence significative entre les I48 et I20 (indiqué par ° sur Fig. 36 b). On observe également une différence significative entre végétatifs et induits à la 20<sup>ème</sup> heure (Test *t* de Student – indiqué par \* sur Fig. 36 b).

De la 16<sup>ème</sup> à la 24<sup>ème</sup> heure après le début du JL, il semble donc qu'il y ait plus de pectines (détectées après traitement à la PME) dans la ZNM que dans la ZM ( $ZM/ZNM < 1$  – Fig. 36 b). Ceci pourrait à nouveau être le reflet de la dégradation des pectines, acides mais aussi méthylestérifiées, dans la seule zone méristématique.

La différence significative entre végétatifs et induits à la 20<sup>ème</sup> h pourrait correspondre à l'importante dégradation des pectines déjà observée à ce moment en microscopie électronique.

A la 48<sup>ème</sup> h, il semble qu'il y ait plus de pectines acides et méthylestérifiées dans la ZM que dans la ZNM ( $ZM/ZNM > 1$  – Fig. 36 b). La pectine nouvellement déposée au sein de l'apex pourrait être responsable de cette augmentation du rapport. Mais il n'existe pas de différences significatives entre végétatifs et induits.

## □ A l'intérieur de la ZM

Rappelons que le calcul de ces rapports n'a été effectué que sur coupes non désestérifiées.

### **L1,L2 et L3+M**

Chez les **végétatifs**, on constate que le rapport des intensités de marquage des zones L1,L2 et L3+M varie au cours du temps (Anova, Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance<sup>21</sup>) (Fig. 37 a). Il est

<sup>21</sup> Ce test est effectué lorsque la variance entre les différents échantillons n'est pas égale. Les différences entre les divers points sont ensuite déterminées par la méthode Dunn's plutôt que par le test de Tuckey.

supérieur à 1 aux 12<sup>ème</sup>, 24<sup>ème</sup> et 48<sup>ème</sup> heures, et proche de 1 aux 16<sup>ème</sup> et 20<sup>ème</sup> heures.

Chez les **induits**, le rapport varie également au cours du temps (Anova, Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance) et décroît régulièrement de 12 à 24 h après le début du JL. De supérieur à 1 à la 12<sup>ème</sup> heure, il devient inférieur à 1 à la 24<sup>ème</sup> heure (la méthode Dunn's indique une différence significative entre les I24 et I12 – indiqué par ° sur Fig. 37 a). A la 48<sup>ème</sup> heure, le rapport est redevenu bien supérieur à 1.

On observe en outre des différences significatives entre les végétatifs et les induits à la 12<sup>ème</sup> heure (Mann-Whitney Rank Sum Test) ainsi qu'aux 24<sup>ème</sup> et 48<sup>ème</sup> heures (Test *t* de Student), indiquées par \* sur la figure 37 a.

---

A la 12<sup>ème</sup> heure, il semble donc que les induits comme les végétatifs ont plus de pectine acide dans L1,L2 que dans L3+M.

De 12 à 24 h, le contenu en pectines acides de L1,L2 semble diminuer chez l'induit jusqu'à devenir inférieur à celui de L3+M (Fig. 37 a). Ceci pourrait refléter une dégradation plus importante des pectines acides dans la zone L1,L2 que dans L3+M.

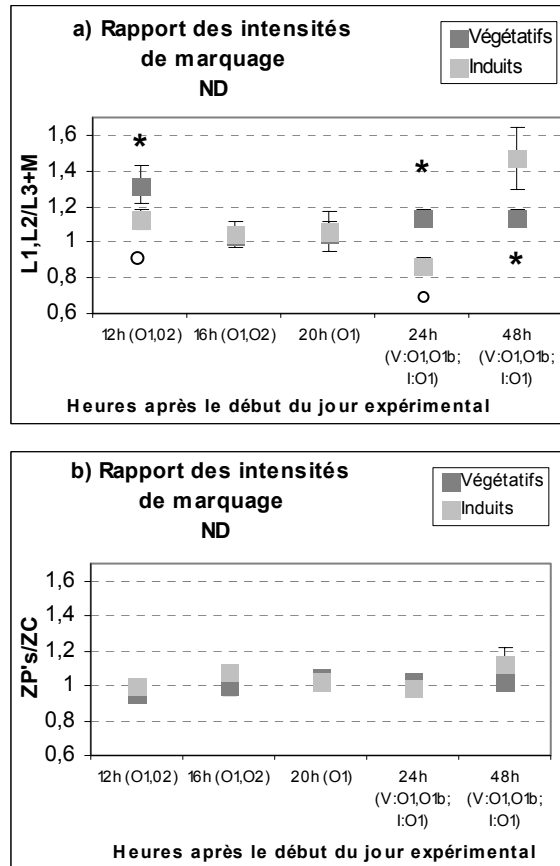
A la 48<sup>ème</sup> heure, le contenu en pectines acides de L1,L2 semble avoir ré-augmenté et être devenu largement supérieur à celui de L3+M (Fig. 37 a). Ceci pourrait aussi représenter la pectine nouvellement déposée, de façon plus importante au sein de la zone L1,L2 que de L3+M, et déjà désestérifiée.

---

## **ZP et ZC**

Chez les **végétatifs**, comme chez les **induits**, on constate que le rapport des intensités de marquage des zones périphériques et centrales des méristèmes ne semble pas varier au cours du temps (Fig. 37 b).

Chez les végétatifs, comme chez les induits, il ne semble pas y avoir de grandes différences entre les teneurs en pectines acides des ZP et ZC.



**Figure 37:** rapport des intensités de marquage à l'intérieur de la zone méristématique, dans des méristèmes végétatifs (V) et induits à fleurir (I) – coupes non désestérifiées (ND). Les barres d'erreur représentent l'intervalle de confiance à 95 %. (a) L1,L2/L3+M - (\* indique une différence significative entre V et I, et o indique une différence significative entre induits – I12>I24). (b) ZP's/ZC. O1 : objet 1 ; O2 : objet 2.

## ■ Discussion générale

Nos observations expérimentales en microscopie électronique ayant déjà fait l'objet de discussions approfondies dans les deux articles présentés, nous ne reprendrons pas ici ces discussions mais nous nous limiterons à l'intégration des observations de la microscopie confocale.

Pour rappel, le marquage des pectines en microscopie électronique a notamment montré la diminution des teneurs en pectines estérifiées (détectées après traitement à la PME ou au NaOH) dans le méristème apical des plantes induites entre la 12<sup>ème</sup> et la 20<sup>ème</sup> heure après le début du jour long. De plus, à la 48<sup>ème</sup> heure, le contenu en pectines était redevenu égal à celui des témoins végétatifs, mais la pectine nouvellement déposée y était presque exclusivement estérifiée par d'autres esters que des méthylesters (pectine détectée uniquement après traitement au NaOH).

---

Le marquage des pectines en microscopie confocale a mis en évidence des modifications intéressantes par rapport à celles observées en microscopie électronique, même si elles sont préliminaires et doivent être confirmées :

- 
- ▶ La dégradation des pectines semble affecter également les faibles quantités de pectines acides présentes au sein du méristème de *Sinapis* et être confinée à la zone méristématique...

L'analyse en microscopie optique a permis de mettre en évidence des modifications des teneurs en pectines acides, détectées par l'anticorps 2F4 sans traitement de désestérification préalable. En effet, l'intensification à l'argent augmente la sensibilité de la technique de marquage à l'or colloïdal. Toutefois, les teneurs en pectines acides du méristème restent très faibles par rapport à celles des pectines estérifiées.

Alors que le rapport des teneurs en pectines acides de la zone méristématique et de la zone non méristématique varie chez les témoins végétatifs, celui-ci est généralement inférieur à 1 de la 12<sup>ème</sup> à la 24<sup>ème</sup> heure chez les induits (moins de pectine acide dans la zone

méristématique que dans la zone sous-jacente) (Fig. 36 a). Ceci pourrait être le reflet de la dégradation des pectines dans la zone méristématique uniquement.

D'autre part, le rapport augmente à la 48<sup>ème</sup> heure et est redevenu largement supérieur à 1 (Fig. 36 a). La désestérification des pectines étant généralement considérée comme un indice de différenciation, cette augmentation du rapport ZM/ZNM à la 48<sup>ème</sup> h chez les induits pourrait être liée au fait qu'à ce moment, le méristème induit se différencie irréversiblement.

On constate de plus que sur coupes désestérifiées à la PME l'évolution du rapport des teneurs en pectines de la ZM et de la ZNM chez les induits est similaire (le rapport ZM/ZNM est généralement inférieur à 1. Il présente un minimum à la 20<sup>ème</sup> h et redevient bien supérieur à 1 à la 48<sup>ème</sup> h) (Fig. 36 b).

Cette inversion de tendance entre 12-24 et 48 h constatée en microscopie confocale (Fig. 36 a et b, mais aussi Fig. 37 a - voir ci-dessous) est en parfait accord avec l'évolution observée en microscopie électronique entre pectines totales des méristèmes induits et végétatifs aux mêmes heures (Fig. 30 c et d).

- La dégradation des pectines semble toucher plus particulièrement les couches cellulaires L1, L2...

Au sein même de la zone méristématique, les teneurs en pectines acides chez les témoins végétatifs, ainsi que chez les induits ne semblent pas varier entre les zones périphériques et centrales (le rapport ZP/ZC est proche de 1) (Fig. 37 b).

Par contre, bien que le rapport des teneurs en pectines acides des zones L1,L2 et L3+M varie au cours du temps chez les témoins végétatifs, on constate que ce rapport varie surtout aux 24<sup>ème</sup> et 48<sup>ème</sup> heures chez les plants induits (Fig. 37 a). Il semble donc qu'au sein de la zone méristématique, ce soient surtout les couches L1 et L2 du méristème qui soient modifiées lors de l'induction, ce qui se manifeste par une plus faible teneur en pectines à 24 h, suivie d'une situation inverse à 48 h (comme observé entre les zones méristématiques et non méristématiques).

Ceci pourrait être à mettre en relation avec les modifications du champ symplasmique superficiel et central lors de la transition florale du SAM de *Sinapis* (Ormenese *et al.*, 2002). En effet, il a été montré que la fréquence des plasmodesmes augmente de la 28<sup>ème</sup> à la 48<sup>ème</sup> heure dans le SAM de plantes induites à fleurir au niveau de toutes les couches cellulaires (L1, L2, L3) et à l'interface entre ces différentes couches, à la fois dans les zones centrales et périphériques du méristème (Ormenese *et al.*, 2000).

Cependant, l'injection d'une sonde fluorescente au sein d'une cellule au centre de la tunica et le suivi de la propagation symplasmique de cette sonde dans le SAM a montré que, malgré l'augmentation uniforme de la fréquence des plasmodesmes dans l'ensemble du SAM de *Sinapis* en transition florale, celui-ci est loin de constituer un unique champ symplasmique. Le champ symplasmique superficiel et central de forme triangulaire et de relativement petite taille chez les témoins végétatifs change de forme et de taille au cours des deux premiers JC suivant le JL. La forme triangulaire est transformée, *via* une forme intermédiaire irrégulière, en une forme circulaire dans le SAM induit à fleurir.

La dégradation des pectines acides du méristème dans les couches cellulaires superficielles (L1,L2) pourrait ainsi être un préalable à cette modification du champ symplasmique.

- L'analyse de la surface des parois semble indiquer que celle-ci se comporte comme un polyélectrolyte dont le gonflement varie en réponse à l'induction florale ...

La mesure en microscopie optique, sur coupes désestérifiées à la PME et marquées avec l'anticorps 2F4, du coefficient de surface de parois attribué à chaque type de zone (et représentant un pourcentage de la surface mesurée pour une zone, occupé par les parois), a montré qu'il existe d'importantes différences entre les méristèmes végétatifs et les induits aux 16<sup>ème</sup>, 20<sup>ème</sup> heures (Fig. 35).

Une paroi plus épaisse dans la zone méristématique chez les induits à la 16<sup>ème</sup> h (Fig. 35 b) pourrait être causée par la dégradation des pectines observée en microscopie électronique. En effet, celle-ci semble commencer dès la 12<sup>ème</sup> h et pourrait favoriser un relâchement des liens

dans la paroi entraînant une épaisseur supérieure par simple augmentation de son hydratation. Chez la fraise, l'inhibition des pectates lyases par une technique antisens résulte en une réduction du gonflement de la paroi (Jiménez-Bermúdez *et al.*, 2002). Le gonflement de la paroi lors du mûrissement est commun à beaucoup de fruits et peut être corrélé à une augmentation de la taille des pores, due à un désassemblage du réseau pectique, induit par des enzymes pectolytiques (Redgwell *et al.*, 1997).

Chez *Chenopodium rubrum*, des variations très précoces de la géométrie de l'apex ont été détectées bien avant le premier pic de mitoses (Albrechtová *et al.*, 2004). Les auteurs attribuent ce gonflement de l'apex à une augmentation de la prise d'eau dans le méristème (et/ou une redistribution de celle-ci), conjuguée à des modifications des propriétés pariétales.

Ces modifications des propriétés pariétales pourraient moduler les tensions en surface de l'apex, tensions connues pour leur rôle clé dans l'organogenèse (Green, 1980, 1988 - repris de Albrechtová *et al.*, 2004). Ainsi, l'application d'une contrainte physique au niveau de l'apex de plantules de tournesol conduit à une organogenèse anormale (Hernandez & Green, 1993). Par contre, une augmentation locale de l'élasticité de la paroi au niveau du méristème apical par l'application d'expansine (une protéine spécifiquement impliquée dans le ramollissement de la paroi) est capable d'y induire l'organogenèse (Cosgrove, 2000b). L'application d'une tension localement peut en outre réguler l'ouverture et la fermeture de canaux ioniques mécano-transducteurs (Green, 1980) et ainsi y jouer un rôle de signal.

Chez *S. alba*, on constate que l'organogenèse est accélérée dès la 24<sup>ème</sup> heure après le début de l'induction florale par un JL (Bernier, 1997). Une augmentation de la taille des cellules est également observée dès la 18<sup>ème</sup> h (Havelange & Bernier, 1974). Cependant, le gonflement de l'apex n'est observé qu'aux alentours de la 48<sup>ème</sup> heure.

D'après Albrechtová *et al.* (2004) le gonflement de l'apex est non seulement lié à une prise d'eau, conjuguée aux modifications des

propriétés pariétales mais également à des variations de pression osmotique.

Chez *Sinapis*, l'induction florale est corrélée à une augmentation des concentrations en saccharose et en calcium au niveau du méristème apical (Lejeune *et al.*, 1993 ; Havelange, 1989 ; Havelange & Bernier, 1993), qui pourraient favoriser l'augmentation de la prise d'eau par les cellules.

La réduction de l'épaisseur des parois à la 20<sup>ème</sup> h (Fig. 35 c) pourrait être liée à un appel d'eau par les cellules méristématiques, ayant pour conséquence la déshydratation des parois. Le remplacement des plus grandes vacuoles des méristèmes végétatifs par un grand nombre de vacuoles plus petites dès la 18<sup>ème</sup> h après le début de l'induction florale (Havelange *et al.*, 1974) - inévitablement corrélée à une augmentation de la surface du tonoplaste et donc peut-être à un nombre plus élevé de canaux ioniques et d'aquaporines - pourrait constituer les prémisses d'une accumulation de substances osmotiques dans la vacuole. Cette accumulation résulterait en une augmentation de la pression osmotique vacuolaire et en un appel d'eau depuis les parois, entraînant ainsi la réduction transitoire d'épaisseur de ces parois par déshydratation.

Cette hypothèse est bien corrélée à l'observation selon laquelle la taille des cellules augmente dès la 18<sup>ème</sup> h après le début du JL (Havelange & Bernier, 1974), l'augmentation de la pression osmotique pouvant résulter en un accroissement de la pression de turgescence. De plus, l'augmentation de l'expression d'une aquaporine a été observée chez *Ch. rubrum* juste avant celle du volume de l'apex (Albrechtová *et al.*, résultats non publiés).

A la 24<sup>ème</sup> heure, les divisions cellulaires synchrones au sein de la zone méristématique (Jacqmard *et al.*, 1998) entraîneraient un retour de l'épaisseur des parois vers des valeurs normales, ce qui se traduirait sur la Fig. 35 d par l'absence de différences significatives entre échantillons végétatifs et induits. La différence significative d'épaisseur des parois entre les zones méristématique et non méristématique pouvant alors être liée au cycle cellulaire plus rapide des cellules méristématiques.



Ces variations précoces de l'épaisseur des parois pourraient être liées à l'arrivée de signaux "hydro-électrochimiques" au niveau de l'apex. L'existence de tels signaux, impliqués dans le contrôle photopériodique de la transition florale, a notamment été postulée par Wagner *et al.* (1998).

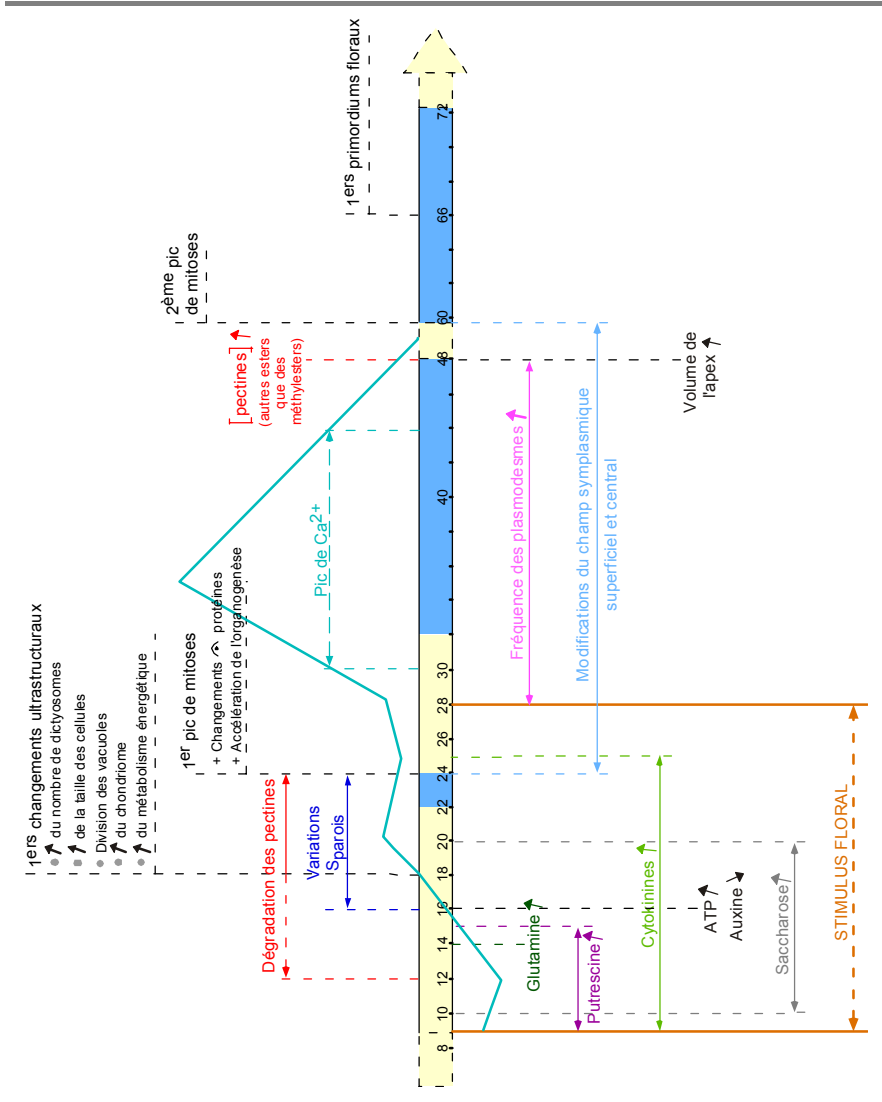
Ainsi, Albrechtová et son équipe (2003) ont montré qu'une des réponses les plus précoces observées au sein du méristème apical de *Ch. rubrum* et liée à l'induction photopériodique de la floraison consiste en une augmentation des concentrations en  $\text{Ca}^{2+}$  et des valeurs de pH, ainsi qu'une modification de leur distribution au sein du méristème. Ces résultats soutiennent l'hypothèse, déjà avancée par Fiedman *et al.* (1992) du rôle du pH et du  $\text{Ca}^{2+}$  dans la transduction des signaux de floraison chez les plantes photopériodiques. De plus, ces augmentations des taux de  $\text{Ca}^{2+}$  et du pH (parallèlement à leur redistribution) ont une cinétique bien corrélée à celle de l'augmentation du volume de l'apex, liée notamment à la prise d'eau par les cellules (Albrechtová *et al.*, résultats non publiés). De telles augmentations à long terme pourraient correspondre aux vagues ultra-lentes<sup>22</sup> (gradients) précédant la morphogenèse chez les animaux.

Chez *S. alba*, on observe également une augmentation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  dans l'apex et les exsudats apicaux suite à l'induction florale. Après une réduction aux 9<sup>ème</sup> et 12<sup>ème</sup> heures, celle-ci augmente dès la 18<sup>ème</sup> h et présente un pic aux alentours des 30-40<sup>ème</sup> h (Havelange, 1989 ; Havelange & Bernier, 1993). Cependant, les méthodes de détection utilisées (microsonde à rayon X pour la localisation au sein de l'apex et spectrophotomètre d'absorption atomique pour le dosage dans les exsudats) étant très différentes de celles utilisées par Albrechtová *et al.* (2003) (sondes fluorescentes *in vivo*), des variations plus précoces des teneurs en  $\text{Ca}^{2+}$  et de la répartition de cet ion au sein de l'apex pourraient exister chez *S. alba* à l'instar de celles observées chez *Ch. rubrum*. En plus de son implication dans l'augmentation de la pression osmotique, le  $\text{Ca}^{2+}$  pourrait jouer un rôle analogue à celui observé chez *Ch. rubrum* : participer à l'élaboration d'un signal hydro-électrochimique migrant de

<sup>22</sup> Par rapport aux fluctuations extrêmement rapides typiques des signaux dans le noyau permettant l'activation de gènes.

façon presque instantanée des feuilles vers l'apex et pouvant être impliqué dans les modifications observées au niveau de l'épaisseur des parois.

- La ligne du temps de la figure 38 situe les modifications des pectines du méristème apical de *Sinapis* par rapport aux autres événements de la transition florale.



**Figure 38 :** ligne du temps (en heures après le début du JL), reprenant les différents changements observés au niveau du méristème de *Sinapis* au cours de la transition florale. Jaune : période de jour, bleu : période de nuit.

# Production et caractérisation d'un polysérum contre les PME

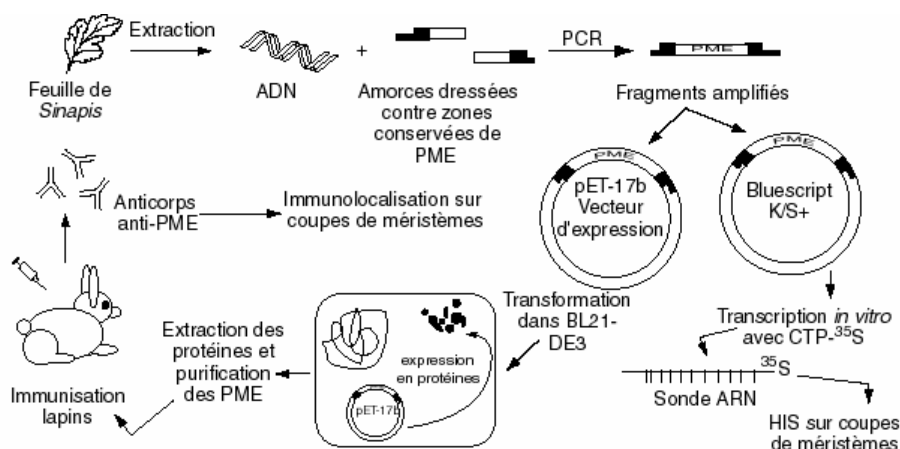
---

La dégradation des pectines du méristème apical, que nous avons mise en évidence dès la 12<sup>ème</sup> heure après le début de l'induction florale, nécessite l'implication d'enzymes pectolytiques, comme les pectine méthylestérases (PME), les pectine acétylestérases (PAE) et les polygalacturonases (PG). Les pectines du méristème étant plus largement estérifiées par des groupements méthyles que par d'autres esters, et les PG ne pouvant agir que sur des pectines désestérifiées, nous avons choisi d'étudier les PME au niveau traductionnel. De plus, nous avons encadré un mémoire de licence (Dauchot, 1999) au cours duquel les PME du SAM de *Sinapis* ont été étudiées au niveau transcriptionnel, par hybridation in situ sur coupes de méristèmes.

Pour les deux approches, nous avons déterminé des amorces dégénérées au niveau de deux régions très conservées (GTXDFFIG et YLGRPWK) à partir d'alignements de différentes plantes proches et moins proches de *Sinapis* (figure 40). Ces amorces ont ensuite été utilisées pour amplifier par PCR les gènes de PME à partir d'ADN génomique de *Sinapis*. Les amorces étant dressées contre des zones extrêmement conservées, on peut estimer que toutes les isoformes de PME peuvent ainsi être amplifiées. Les régions amplifiées sont ensuite clonées dans des vecteurs, différents, selon qu'il s'agit de l'étude au niveau de la transcription ou de la traduction (figure 39).

Contrairement à la plupart des sérums existants qui ont été dirigés contre des isoformes glycosylées, purifiées directement des tissus, nous avons choisi de produire un polysérum dirigé contre la partie protéique des PME. Ceci, afin d'éviter les problèmes d'aspécificité liés à la reconnaissance de la partie glycosylée, notamment rencontrés avec le polysérum de Mareck *et al.* (1995) (Balangé PA, communication personnelle). Récemment, Al-Qsous *et al.* (2004) ont publié les résultats concernant la production d'un polysérum par une approche similaire à la nôtre. Ce sérum est dirigé contre la région N-terminale du domaine

conservé « esterase-like » et a déjà permis l'identification de plusieurs isoformes de PME actives dans les plantules de lin mais n'a pas encore été utilisé en immunocytochimie.



**Figure 39 :** résumé des différentes étapes pour l'étude des PME au niveau traductionnel et transcriptionnel.

En ce qui concerne l'étude au niveau de la transcription du gène, les fragments amplifiés ont été clonés dans le plasmide Bluescript II K/S + qui possède deux promoteurs inversés à droite et à gauche du site de clonage. Ces promoteurs permettent, selon l'orientation de l'insert, de fabriquer des sondes sens et antisens. Ces sondes, marquées au <sup>35</sup>S sont ensuite utilisées pour hybridation in situ (HIS) sur coupes de méristèmes végétatifs et induits. N. Dauchot, au cours de son mémoire de licence (1999), sous ma supervision, a réalisé ce volet jusqu'aux premières mises au point de l'HIS avec ce type de sonde. Un marquage a été obtenu au niveau des épidermes, ce qui est en accord avec les résultats obtenus par Mareck *et al.* (1995) chez le lin. L'immunodétection de PME avait en effet montré un marquage plus important au niveau de la zone apicale et des épidermes de l'hypocotyle. Toutefois, la technique d'HIS nécessitait encore beaucoup de mises au point. Nous avons donc préféré nous concentrer sur l'étude au niveau de la traduction, par la production du polysérum anti-PME, qui était déjà bien entamée à l'époque, et son utilisation sur coupes de méristèmes.

|           |     |                                                                    |
|-----------|-----|--------------------------------------------------------------------|
| AtPME1_94 | 1   | MDSVNSFKGCGKUEAQDLALGGKTRGRLLLLSISUUVL IAVI IAAUATVAKHGHNE ST      |
| AtPME1_96 | 1   | MDSVNSFKGCGKUEAQDLALGGKTRGRLLLLSISUUVL IAVI IAAUATVAKHGHNE ST      |
| AtPME2    | 1   | -----EFLSK-FSD-----FKM--MKGLILSSAAIALLLASIVGIAATTMTQKHQK-          |
| AtPME3    | 1   | HAPSMKEITS-KDN-----FKK--MKGLVLLSAUALLVAAVAGISAGASKAMEKR--          |
| PMEU1     | 1   | MTRVEDTFEK-QID-----FKK--RCKKLYLAIUASULLVAAVIGUAGAGKSHKNSDD         |
| AtPME4    | 1   | -----MIGKVVUVAASILLVUGVAVIGUATIKHG-----                            |
| Bp19      | 1   | -----HAGKLVISUASMLLVUGVAVIGUATVFNKGGGAGG-                          |
| AtPME1_94 | 61  | PSPPPELTPS--TSLKAI CSUTRIPES C133 ISELP--SSNTTIPETL FKL SLKVI IDEL |
| AtPME1_96 | 61  | PSPPPELTPS--TSLKAI CSUTRIPES C133 ISELP--SSNTTIPETL FKL SLKVI IDEL |
| AtPME2    | 46  | ---ITTLFTSHA LKSVCSSTLYPEL C13 AVAATG--GKELT SQKEVIEASNLTTKAV      |
| AtPME3    | 50  | -----TLSPSSHA LRS CSSTRYPEL C13 AVATAG--ACELT SQKDVIEASNLIT AV     |
| PMEU1     | 52  | HADIMAISSSAHA VKS ACSTLHPEL CYS AIUVSDFSKQVTSQKDVIELSLNITVKAV      |
| AtPME4    | 31  | ---DANLSPQ-MKAUQGICQSTSDKASCUKTLDPVK-----SEDPMKL IKAHMLATDEL       |
| Bp19      | 36  | ---DKTLNWS-QKA/ESL CASATDKGS CAKTLDPVK-----SDDPSKL IKAHMLATDEL AV  |
| AtPME1_94 | 117 | D3IS-DLPEKLSKETE--DERIKSALRVCGDLIEDALRLNDTVSAIDDEEKGKTLSSSK        |
| AtPME1_96 | 117 | D3IS-DLPEKLSKETE--DERIKSALRVCGDLIEDALRLNDTVSAIDDEEKGKTLSSSK        |
| AtPME2    | 101 | KHNY-FAVKGL IAKRKGLTPREUTALND CLET IDETLELHVAVEDLHQYTPKQSLR-KH     |
| AtPME3    | 101 | KHNY-FTVKGL IKRKGLTPREUTALND CLET IDETLELHVAVEDLHQYTPKQSLR-EN      |
| PMEU1     | 112 | RHNY-YAVKEL IKTRKGLTPREKVALND CLETMDETLELHRTAVEDLELYPMKSLK-EN      |
| AtPME4    | 62  | TKSNFTGQTEVNHGSSISPMKAVLDYCKRVHYALDELATIIEEMG--EDLSQIG-SK          |
| Bp19      | 67  | TKSNFTASTEEGAGKKNINATSKAVLDYCKRVHYALDELATIIEEMG--EDLSQIG-SK        |
| AtPME1_94 | 174 | IEDLKTWLSATVTHETCFDSELDLQNKTEYANSTITQMLKSAMSRSTEFTSNLSAIVS         |
| AtPME1_96 | 174 | IEDLKTWLSATVTHETCFDSELDLQNKTEYANSTITQMLKSAMSRSTEFTSNLSAIVS         |
| AtPME2    | 159 | ADDLKTILSSAITMQETCLDGFSDHDD-----ADKQVKALLKGGQHVHMHCSNALM IK        |
| AtPME3    | 161 | AGDLKTLILSSAITMQETCLDGFSDHDD-----ADKQVKALLKGGQHVHMHCSNALM IK       |
| PMEU1     | 170 | VEDLKTILSSAITMQETCLDGFSDHDD-----ADKQVKULLKGGQHVHMHCSNALM IC        |
| AtPME4    | 129 | IDQLKQMLIGUYFWQTDCLDDIEEDD-----LRKAIGEIGIANSKILITNAIDITH           |
| Bp19      | 144 | MDQLKQMLTGFYFWQTDCLDDIEESE-----LRKUMGEIGIANSKILITNAIDITH           |
| AtPME1_94 | 204 | KILSALSBLGIP IHRRLRLMSH-----HQQQSWD                                |
| AtPME1_96 | 204 | KILSALSBLGIP IHRRLRLMSH-----HQQQSWD                                |
| AtPME2    | 213 | N---MTETDIANTELKDKFTN-----LHQQQQKRLKEVT-----GDLSDSG                |
| AtPME3    | 213 | N---MTETDIANTELKAKITS-----NHRKLEENQETTVAUD IAGAGELDSGE             |
| PMEU1     | 224 | N---MTETDIAN-ENKLSAPA-----NHRKLEU                                  |
| AtPME4    | 109 | TUVSAMAKIMKVIDLKNITGGIPTGAPPVUDESPPADPDGAPRR-----LLEDIHETG         |
| Bp19      | 194 | ALTAMSKQMKVUIDMKKGN-----LGETPAPDRD-----LLEDLDQKG                   |
|           |     | <i>Site de clivage du propeptide</i>                               |
| AtPME1_94 | 263 | IEKVAR--RRLIQTAG-----LKPDUTVAGDGTGDLTVMEAVA                        |
| AtPME1_96 | 263 | IEKVAR--RRLIQTAG-----LKPDUTVAGDGTGDLTVMEAVA                        |
| AtPME2    | 251 | UPKQLSUGRRLIQGST-----IKADATVANDGSGDIDNGSAAVA                       |
| AtPME3    | 261 | UPKQLSAGRRLIQSG-----VKRDATVANDGSGDTKTUAAVA                         |
| PMEU1     | 252 | UPKQLSAGRRLIQST-----VTPDUUVAADGSGDXTUSEAAR                         |
| AtPME4    | 244 | IPTUUSGAKRLMAKAGR-----GR-RGGRGGGARMTNPUVKDGSQGKHTUQQAUD            |
| Bp19      | 203 | LPIKQNSDKRLMAAGRPAGAPADEGIGEGG-GGGGKPKTHUVAKDGSQGKHTISEAVK         |
| AtPME1_94 | 300 | KUPKKSLSMFIYUKSGTYUENVUVDKSKUMVIYGDGKGKTIISGSKNFV--DGTPTYE         |
| AtPME1_96 | 300 | KUPKKSLSMFIYUKSGTYUENVUVDKSKUMVIYGDGKGKTIISGSKNFV--DGTPTYE         |
| AtPME2    | 291 | AAPKESNHRV IYIKAGUYRENVETKGGTNIMHPLGDGRGKTIITGSRNVV--DGTPTIH       |
| AtPME3    | 301 | AAPENSNHRV IYIKAGUYRENVVAKGGKNIMHMGDGRTRITITGSRNVV--DGTPTIH        |
| PMEU1     | 292 | KAPKESSKRV IYIKAGUYRENVDPKGGTNIMHMGDGRKNTITITASRNVV--DGTPTIH       |
| AtPME4    | 296 | ACPENNRGRC IYIKAGLYREQVIIPKGGKNIMHFGDGARKTIVISYNRVVALSRGTTTSL      |
| Bp19      | 292 | ACPEKNPGRCIYIKAGUYKEQVIIPKGVNVIMFGDGATQTIITIDRSUGLSPGTTTSL         |
| AtPME1_94 | 356 | TATFAIQGKGFIMD IGIINTAGAAKQAVAFSGSDISVYVYQCSIDGFQDILYVHNRQ         |
| AtPME1_96 | 356 | TATFAIQGKGFIMD IGIINTAGAAKQAVAFSGSDISVYVYQCSIDGFQDILYVHNRQ         |
| AtPME2    | 349 | SATVAAUGERFLARDITFQNTAGPSKHQAVALLBUSDISAFYQCDMFATYQDILYVHNRQ       |
| AtPME3    | 359 | SATVAAUGERFLARDITFQNTAGPSKHQAVALLBUSDISAFYQCDMLAYQDILYVHNRQ        |
| PMEU1     | 350 | SATUUVAGKFLARDITFQNTAGASKHQAVALLBUSDLSAFYRCIMLAYQDILYVHNRQ         |
| AtPME4    | 356 | SATVE--SEGTHAMMGITKNTAGPHGQAAAIDUNGDAUVIFNCRIDGYQDILYVHNRQ         |
| Bp19      | 352 | SGTVQVESSEGINAM IGFQNTAGPLGKQAVAFUNGDAUVIFNCRIDGYQDILYVHNRQ        |

**Figure 40 (acides aminés 1-417):** alignement (séquences des acides aminés) de PME de plantes proches et moins proches de Sinapis. Zone du site de clivage du polypeptide et zones conservées à partir desquelles les amorces ont été déterminées. AtPME 1 (94) (X 81585), AtPME 1 (96) (X 81585), AtPME 2 (U 25649), AtPME 3 (AF 033204), AtPME 4 « flower specific » (AF 077855), Bp19 (X 56195), PMEU 1 (U 49330).

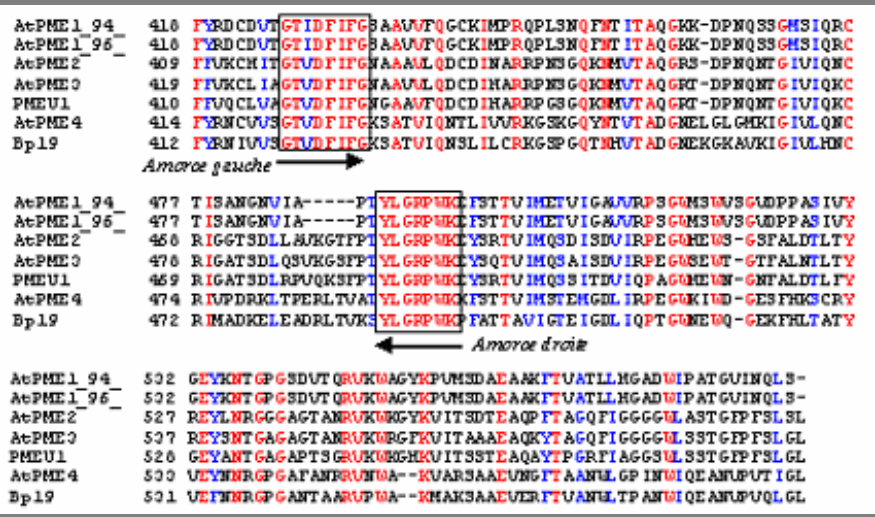


Figure 40 (acides aminés 418-fin)

## ■ Matériels & méthodes

### Clonage d'une zone conservée de PME de *Sinapis*

#### Clonage dans *pMOS* (ou *pCRII*)

L'ADN de *Sinapis* est préparé d'après le protocole de Murray & Thompson (1980) pour maxi-prep. Les fragments de PME ( $\approx 250$  pb) sont ensuite amplifiés par PCR (Mini Cyclor™ MJ Research – Biozym), utilisant des amorces (5'-GGCGAATTCGGGGDACMRTHGAYTTYATHHTTCGGV-3' et 5'-AGCCTCGAGCGGYTTCCAHHGMCKDCCHARRTA-3' à une concentration de 50  $\mu$ M), déterminées afin d'introduire les sites de restriction EcoRI et XhoI. Après une dénaturation longue (10 min.), le programme PCR utilise des températures d'hybridation de 50°C pour les 8 premiers cycles et de 65°C pour les 24 suivants. Deux amplifications successives (2<sup>ème</sup> amplification à partir de 5  $\mu$ l du mélange de la première PCR) sont nécessaires afin de permettre la détection sur gel.

Les fragments amplifiés sont purifiés sur colonnes (Amicon Microcon 100 ou QIAquick Nucleotide Removal Kit - QIAGEN) ou par extraction du gel (QIAEX II Agarose Gel Extraction commercialisé - QIAGEN). A chaque étape, les fragments amplifiés et/ou purifiés sont analysés sur gel

d'agarose. Leur taille est estimée par comparaison avec un marqueur (Smart Ladder). L'ADN est visualisé par ajout de bromure d'éthidium au gel d'agarose puis observation sous UV ( $\lambda = 302$  nm), et le tampon de chargement des gels est composé de bleu de bromophénol (type IV) (protocole décrit par Sambrook *et al.*, 1989). Cuve d'électrophorèse: Pharmacia LKB GNA100 – migration à une intensité de 75 à 80 mA.

Après purification, les produits d'amplification des PME de *Sinapis* sont ligués dans le vecteur pMOSBlue T<sup>23</sup> (Amersham, clonage T-A), selon les instructions du fabricant. Des bactéries TOP10F' sont ensuite transformées par choc thermique avec les vecteurs recombinants (kit One shot - Invitrogen) et cultivées sur milieu LBA (Sambrook *et al.*, 1989), additionné de 85 µg/ml d'ampicilline ainsi que 35 µl de X-Gal (50 mg/ml) et 20 µl d'IPTG (100 mM) par boîte de pétri.

La présence de l'insert est vérifiée par PCR sur les colonies blanches, utilisant les amorces permettant l'amplification des PME (amorces de l'insert), comme décrit plus haut. Les clones positifs sont en même temps repiqués sur milieu LBA + Amp et séquencés. La PCR préparative au séquençage utilise les amorces Forward et Reverse (5 pmol/25 µl), externes à l'insert, avec le programme suivant : dénaturation longue (4,5 min.), 35 cycles avec température d'hybridation de 55°C et élongation longue.

Les produits de cette PCR préparative sont purifiés indifféremment via une des méthodes exposées précédemment puis séquencés à l'aide du kit « ABI PRISM - BigDye Sequencing Terminator » et selon leurs instructions. Le séquençage est réalisé pour chaque fragment au départ de Forward (F) ou de Reverse (R) afin d'obtenir la séquence des deux brins complémentaires. Séquenceur automatique : ABI PRISM 377 DNA (Perkin Elmer). Le programme PCR est composé de 25 cycles avec des T° de dénaturation, hybridation et élongation de 96, 50 et 60°C, respectivement.

---

<sup>23</sup> Le kit TA Cloning® (Invitrogen), a également été utilisé au cours de nos travaux. Il utilise le vecteur pCR II, un analogue à pMOS (2,98 kb), mais d'une taille de 3,9 kb. La ligation dans pCR II utilise un protocole légèrement différent, décrit dans le manuel accompagnant le kit TA Cloning® (Invitrogen).

La séquence SaPME 4 isolée précédemment (Dauchot, 1999), a été sous-clonée par PCR sur une colonie TOP10F'/pBluescript II KS+/SaPME4, utilisant nos amorces PME (amorces de l'insert). Après purification, les fragments amplifiés sont clonés dans pCR II<sup>24</sup> (clonage TA). Le vecteur pCR II-SaPME 4 est ensuite transféré dans les bactéries TOP10 F'. L'évaluation des clones se fait par PCR et séquençage.

### ***Clonage dans pET-17b – vecteur d'expression***

Trois séquences ont été sélectionnées parmi toutes celles isolées: SaPME 1, SaPME 3 et SaPME 4. Les vecteurs pMOS (ou pCRII)-SaPME correspondants sont isolés par la méthode de la lyse alcaline (mini-préparation d'ADN plasmidique - Sambrook *et al.*, 1989) et leur concentration est estimée sur gel d'agarose, après linéarisation d'une partie par EcoRI. La restriction avec EcoRI (Réact. 3-GibcoBRL) et XhoI (Réact. 2-GibcoBRL) permet l'excision des inserts SaPME et leur insertion dans le plasmide pET-17b, restreint avec les mêmes enzymes (ligation de « bouts collants »). Les plasmides pET-17b et les inserts SaPME, ainsi restreints, sont purifiés par extraction du gel (kit QIAEX II). Les réactions de restriction et de ligation dans pET-17b sont décrites dans le manuel du système pET (Novagen).

Les bactéries TOP10 F' transformées par choc thermique (kit « One Shot » - Invitrogen) sont sélectionnées sur milieu LBA + Amp (85 µg/ml). La présence de l'insert est vérifiée par PCR sur colonie, utilisant les amorces PME. Les clones sélectionnés sont séquencés comme décrit plus haut, mais avec les amorces T7 promoter et T7 terminator (T° d'hybridation : 50 °C).

Pour transformation dans les bactéries BL21-DE3, permettant l'expression en protéines, les plasmides pET-17b-SaPME sélectionnés sont isolés par mini-prep (lyse alcaline, Sambrook *et al.*, 1989) et leur concentration est déterminée par linéarisation d'une partie avec EcoRI et analyse sur gel d'agarose. Les cellules d'*E. coli* sont rendues compétentes pour transformation par choc thermique par la méthode au chlorure de

---

<sup>24</sup> Seul ce clone SaPME 4 se trouve dans pCR II.  
Nos séquences SaPME (1 et 3) ont, elles, été clonées dans pMOS.



calcium (Sambrook *et al.*, 1989). Les clones recombinants sont enfin sélectionnés et séquencés comme ci-dessus. La phase de lecture ainsi que l'orientation de l'insert PME sont vérifiées avant induction de l'expression en protéines. Des bactéries BL21-DE3 transformées avec le vecteur pET-17b sans insert sont utilisées comme contrôle.

### **Expression des protéines**

Les cellules BL21-DE3 contiennent le gène codant pour la T7 ARN polymérase qui permet la surexpression des inserts après induction à l'IPTG. Nous avons employé deux méthodes différentes pour l'extraction et la purification des protéines : l'une à partir de cultures à grande échelle (nécessitant une nuit de culture après induction), et l'autre à partir de cultures de 100 ml (nécessitant seulement 3 heures de culture après induction).

#### ***Induction à l'IPTG***

L'induction des protéines se fait comme décrit par Benet & Van Cutsem (2002), ainsi que dans le manuel du système pET (Novagen), par ajout de 0,4 mM d'IPTG à la culture bactérienne lorsque celle-ci a atteint une DO  $\approx 0,4-0,6$ , et culture à 37°C pendant 3 heures avant la collecte des cellules par centrifugation. Comme conseillé dans le manuel du système pET pour les inserts pouvant être toxiques, nous avons augmenté la concentration en antibiotique (jusqu'à 500 µg/ml) et utilisé du milieu TB (Terrific Broth).

#### ***Extraction des protéines et purification***

La purification des protéines de fusion obtenues, sur colonne T7tag, a principalement été utilisée pour le clone SaPME 3 alors que les clones SaPME 1 et 4 ont en général été purifiés par dépôt sur gel d'acrylamide et élution de la bande d'intérêt.

L'extraction des protéines pour l'établissement d'une courbe d'expression de l'insert est réalisée comme décrit dans le manuel du système pET (Novagen).

### ***Purification T7tag***

La protéine de fusion produite possède, à l'extrémité N-terminale, le T7tag (11 acides aminés), qui permet la purification sur colonnes d'affinité. La méthode d'extraction des protéines est celle décrite par Novagen pour 100 ml de culture et est reprise par Benet & Van Cutsem (2002).

Brièvement, trois heures après induction de la culture bactérienne, les cellules sont collectées par centrifugation et les protéines des fractions soluble et insoluble (corps d'inclusion des bactéries) sont extraites par sonications répétées (sonicateur Bandelin sono-plus GM-2070). La fraction insoluble est incubée en conditions dénaturantes (urée 6 M - pendant une heure) avant dilution jusqu'à une concentration en urée de 2 M. Les fractions solubles et insolubles sont ensuite filtrées sur acrodisc 0,45 µm et chargées directement sur la colonne de purification T7 tag, sans congélation préalable.

Les protéines SaPME 1 et SaPME 4 précipitant à une concentration en urée de 2 M dans la fraction insoluble, elles sont récoltées par centrifugation 10 min. à 15000 g après une heure de précipitation à température ambiante. Les culots (précipités T7 tag) sont resuspendus dans 1 ml de tampon de chargement des gels SDS-PAGE 1 x et conservés à -20°C. Les protéines de fusion sont ensuite purifiées par dépôt sur gel d'acrylamide et élution des bandes d'intérêt. Pour obtenir suffisamment de matériel, plusieurs précipités T7 tag sont regroupés et concentrés sur centricon (Millipore - CO : 3500 Da) avant dépôt sur gel.

La purification sur colonne d'affinité T7tag est réalisée selon le protocole décrit par Novagen pour les fractions soluble (conditions non dénaturantes) et insoluble (conditions dénaturantes – 2 M urée).

### ***Purification par élution du gel***

La purification des protéines SaPME par dépôt sur gel d'acrylamide, découpage de la bande d'intérêt et élution du gel a été utilisée pour les précipités T7 tag, obtenus comme décrit plus haut, mais également pour les fractions insolubles extraites de cultures à grande échelle. Pour ces dernières, nous avons réalisé de grands gels d'acrylamide, afin de pouvoir

éluer de grandes quantités de protéines à injecter aux lapins pour immunisation.

Le protocole d'extraction des protéines pour cultures à grande échelle est celui décrit par Novagen pour l'extraction de la fraction insoluble en vue de la purification sur colonne d'affinité T7tag, adapté pour de gros volumes de culture (1L).

### ***Gel d'acrylamide – SDS-PAGE***

Les gels SDS-PAGE sont préparés comme décrit par Sambrook *et al.* (1989) et montés dans l'appareil d'électrophorèse (Petits gels : Mini protean II Cell – BioRad. Grands gels : Protean II xi Slab Cell – BioRad. Tampon d'électrophorèse : Tris 25 mM/Glycine 250 mM pH 8,3 - SDS 0,1 %. Migration avec un voltage de 150 V pour les petits gels et une intensité de 60 mA/gel pour les grands gels).

Avant dépôt sur gel, les échantillons sont chauffés 3 min. à 100 °C dans le tampon de chargement des gels SDS-PAGE à une concentration finale de 1 x (50 mM Tris-HCl pH 6,8 - 100 mM DTT (dithiothreitol) - 2 % SDS - 0,1 % bleu de bromophénol - 10 % glycérol), refroidis sur glace et chargés dans les puits avec un marqueur de taille coloré (BioRad). Les gels peuvent ensuite être colorés au bleu de Coomassie comme décrit par Sambrook *et al.* (1989). Après réhydratation ils sont séchés sous film plastique, selon le système de BioRad.

### ***Elution du gel***

Les bandes correspondant aux protéines de fusion sont identifiées par comparaison avec une portion du gel contenant le marqueur de taille, ainsi qu'une partie de la zone de migration de la protéine à éluer, colorée au bleu de Coomassie. Elles sont ensuite découpées, extraites par électroélution, comme décrit dans le manuel accompagnant l'électroélutor (Modèle 422 – BioRad ; capuchons à membrane de dialyse - BioRad - CO : 3500 Da ; tampon d'élution : Tris 25 mM/Glycine 192 mM/SDS 0,1 % ; intensité de 8 à 10 mM par tube durant 3 à 5 heures) et conservées à -20°C.

### ***Concentration des protéines par précipitation à l'acétone***

Cette technique a été utilisée, lorsqu'elle était nécessaire, pour concentrer les protéines éluées ou purifiées sur colonne avant injection aux lapins. L'échantillon à concentrer est mélangé à 6 volumes d'acétone froid, précipité 30 min. à -70 °C et centrifugé 10 min. à 13000 rpm. Après séchage, le culot est resuspendu dans 500 µl de tampon de chargement des gels SDS-PAGE (1x).

### **Immunisation des lapins**

Les protéines d'intérêt (SaPME 1, 3 ou 4) éluées, ou purifiées sur colonne T7tag, et dont le volume est amené à 500 µl, sont mélangées à 500 µl de Quil A (purified saponin QuilA lyophilized – Superfos Biosector a/s) (Sjölander *et al.*, 1997 ; Rönnberg *et al.*, 1997) et administrées en sous-cutané, après stérilisation par filtration sur Acrodisc 0,22 µm. Elles sont ensuite injectées à des lapins (deux lapins femelles différents pour chaque protéine – hybride New Zeland Californian, IFFA credo), avec rappels 7, 28, 56, 63 et 99 jours plus tard. Les titres en anticorps restant faibles, nous avons réalisé deux nouvelles injections 87 et 102 jours plus tard. Une dernière série d'injections a été réalisée quatre mois plus tard avec rappels après 14 et 21 jours, utilisant des protéines purifiées de la meilleure façon possible. La totalité des sérums a été récoltée 9 jours après le dernier rappel.

### **Caractérisation des polysérums**

#### ***Dot Blot et Western Blot***

Pour les Dot Blots, les antigènes (2 x 5 µl maximum), dilués en Tp. TBS (20 mM Tris, 500 mM NaCl – pH 7,5) sont déposés sur membrane de nitrocellulose (Hybond C-extra – Amersham), manuellement ou avec l'appareil Bio-Dot™ (BioRad). Après séchage, la membrane est saturée 30 min. en Tp. TBS+BSA 3 % (Sigma), rincée 15 min. en Tp. TBS - Tween 20 0,1 % (TBST), puis incubée 30 min. dans l'anticorps primaire (polysérum SaPME, dilué en Tp. TBS+BSA 1 %). Après rinçage 3 x 5 min. en Tp. TBST, elle est incubée 30 min. dans un anticorps secondaire, dilué en Tp. TBS+BSA 1 % et rincée à nouveau 3 x 5 min. en Tp. TBST. Nous avons utilisé deux types d'anticorps secondaires : Donkey anti-

rabbit IgG peroxydase conjugate (Amersham, 1:400) ou Goat anti-rabbit IgG (whole molecule) alkaline phosphatase conjugate (Sigma, 1:30000 ou 1:15000 pour de grandes quantités d'antigènes). La membrane est ensuite révélée avec le système colorimétrique correspondant : peroxydase (10 ml MeOH, 60 mg HRP - Horse Raddish Peroxydase, BioRad - 50 ml Tp. TBS, 30 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 % - Merck), phosphatase alcaline (NBT/BCIP, selon les instructions du fabricant – Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA). L'anticorps monoclonal de souris, anti-T7tag (Novagen), est directement couplé à la phosphatase alcaline et ne nécessite donc pas d'incubation avec un anticorps secondaire.

Pour les Western Blots, les protéines séparées sur gel SDS-PAGE (12 ou 15 %) sont transférées par électroélution (2-4 heures à 10°C, 0,8-1 A, 100 V) sur un support solide - membrane de nitrocellulose (Hybond-C Extra - Amersham) ou PVDF<sup>25</sup> (Schleicher & Schuell PVDF transfer membrane 0,2 µm) - en système immergé (Transphor - Hoefer - TE 50 x) dans un tampon de transfert (Towbin : 192 mM glycine, 25 mM Tris (pH 8,3), 1,3 mM SDS (0,1 %), MeOH 15 %). Après transfert, la membrane est traitée comme décrit pour les tests Dot Blots.

### ***Extraction de protéines d'épuisement contre E. coli et le T7 tag***

Les bactéries BL21-DE3/pET-17b/sucrose synthase sont cultivées et induites à l'IPTG comme décrit par Benet & Van Cutsem (2002). Une nuit après induction de la culture bactérienne (1 L), les cellules sont centrifugées 5 min. à 5000 g (4°C) et le culot est resuspendu dans 100 ml de Tp. Tris-HCl 50 mM pH 8 - EDTA 2 mM + 100 µg/ml lysosyme + 10 ml de Triton X-100 1 %. Après incubation 15 min. à 30 °C, la solution bactérienne est soniquée 4 x 1 min. à 4°C (sonicateur BANDELIN, Soniplus) et centrifugée à 12000 g pendant 15 min. à 4°C (centrifugeuse BHG Hermle ZK364). Le culot (fraction insoluble) est enfin resuspendu dans 4 ml de tampon de chargement des gels SDS-PAGE (1x) et analysé sur gel.

---

<sup>25</sup> Les membranes PVDF retiennent mieux les petits poids moléculaires que les membranes de nitrocellulose.

Les quantités de protéines d'épuisement utilisées varient avec la dilution des polysérums, ainsi qu'avec la qualité de l'épuisement ainsi obtenu. L'obtention d'un épuisement total à la dilution du sérum SaPME la plus faible (12,5 x) nécessite jusqu'à 50 % (du volume final) de protéines (*E. coli* + sucrose synthase) 0 x, et ceci sans interférence avec la qualité de la réponse obtenue. Les polysérums épuisés une heure à RT sont centrifugés 10 min. à 7500 rpm avant l'utilisation en Dot Blot, Western Blot, ou immunocytochimie.

### ***Extraction des protéines pariétales de Sinapis***

Ces protéines sont utilisées comme antigènes, en Dot Blot et Western Blot, afin de vérifier leur reconnaissance par nos polysérums SaPME. Après broyage dans l'azote liquide d'une plante entière de *Sinapis* (avec les racines), on ajoute 10 ml de NaCl 1 M pH 7 contenant des inhibiteurs de protéases (Complete™ protease inhibitor cocktail tablets – Boehringer) et on incube 30 min. à 4°C sous agitation. Le mélange est ensuite centrifugé 10 min. à 4000 rpm, filtré sur Acrodisc 0,45 µm, aliquoté et conservé à -70°C.

### ***Vérification de l'activité PME dans les extraits végétaux***

Le protocole du test au rouge de rhuthénium est tiré de l'article de Downie *et al.* (1998).

### **Purification des polysérums**

Nous avons testé différentes méthodes de purification du polysérum SaPME par affinité contre son antigène (purification positive. Cette méthode est décrite par Benet & Van Cutsem (2002). Quatre tests ont été réalisés : trois avec des tampons d'élution acides (Bioprotocol™, URL : <http://info.med.yale.edu/mbb/koelle>; Reichelt *et al.*, 1999 ; Yamaya *et al.*, 1992) et un avec un tampon au thiocyanate de potassium (Earnshaw & Rothfield, 1985).

### **Immunocytochimie**

Pour les tissus inclus en résine LRW, la technique de marquage est celle de l'intensification à l'argent (Sobry *et al.*, sous presse), avec quelques modifications.

Pour les tissus non inclus, le protocole est le suivant : les coupes à main levée de pétioles de *Sinapis* sont saturées 30 min. en tampon TBS (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8,2) additionné de BSA 0,5 % et Tween 20 0,1 %. La concentration en sels est réduite afin d'éviter l'extraction des PME. Elles sont ensuite incubées 90 min. dans le polysérum SaPME 3 épuisé, dilué en tampon TBST additionné de BSA 0,5 %. Après plusieurs rinçage en tampon TBST, elles sont incubées 60 min. avec un anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline (Goat anti-rabbit IgG, whole molecule, alkaline phosphatase conjugate, dilution 1:50, Sigma), rincées à nouveau et révélée avec comme substrat le fast red TR/AS-MX naphthol phosphate, rouge, spécial pour l'immunocytochimie et l'observation au microscope optique (Sigma). Dans certains cas, nous avons également utilisé la technique de détection par intensification à l'argent du marquage à l'or colloïdal. L'anticorps secondaire utilisé le suivant : Goat anti-rabbit IgG (H+L) (Human Abs) – 5 nm (LMGAR5 – British BioCell International). Le protocole est identique, si ce n'est que la révélation est effectuée avec le kit d'intensification à l'argent, fourni par le même fabricant (BBI).

## ■ Résultats

### Clonage d'une zone conservée de PME de *Sinapis*

---

#### ● Clonage dans pMOS (ou pCRII)

Les amorces ainsi définies ont été utilisées pour réaliser une amplification sur ADN génomique extrait de jeunes feuilles de *Sinapis*. Les fragments amplifiés ont ensuite été insérés dans le plasmide pMOS, utilisé pour transformer *E. coli* (TOP10F'). Le séquençage des clones positifs (au départ de Forward et Reverse, séquences spécifiques du vecteur pMOS) a permis de répartir les fragments amplifiés avec nos amorces en deux classes : l'une donnant des inserts d'environ 250 pb et l'autre de 240 pb<sup>26</sup>. Les séquences PME partielles de *Sinapis* sont nommées SaPME, par analogie avec la dénomination utilisée chez *Arabidopsis*. Les alignements en acides aminés des séquences SaPME et AtPME sont présentés figure 41. Alors que ceux, en acides aminés et en bases, des séquences SaPME entre elles sont présentés figures 42 et 43, respectivement.

N. Dauchot (1999), au cours de son travail sur l'HIS de PME de *Sinapis* a également isolé des clones ressemblant à AtPME 1, mais aussi à AtPME 4, spécifique des fleurs. Cet insert étant cloné dans le vecteur pBluescript II K/S +, il était nécessaire de le sous-cloner afin de le transférer dans pCR II (pMOS n'étant plus utilisé au laboratoire à ce moment). Les clones positifs (TOP 10 F') ont ensuite été séquencés comme ci-dessus.

Par la suite, nous avons sélectionné une seule séquence de chaque classe. Ainsi, SaPME 45 a été sélectionné et utilisé pour la suite des travaux comme SaPME 1, car homologue d'AtPME 1, et SaPME 8 a été sélectionné comme SaPME 3.

Les trois isoformes ont été utilisées pour la production de sondes radioactives aussi bien que pour la production des anticorps polyclonaux.

---

<sup>26</sup> Taille englobant l'insert PME proprement dit, ainsi que les sites de restriction EcoRI et XhoI ajoutés aux amorces.



Nous avons en effet estimé qu'un mélange de sondes pour l'HIS ou un mélange d'anticorps, provenant d'isoformes différentes allait augmenter les chances de reconnaître l'ensemble des PME.

### ■ Trois clones ressemblant à AtPME 1 :

|         |   |                                                               |
|---------|---|---------------------------------------------------------------|
| AtPME1  | 1 | GTIDFIFGSAAVVFQGGCKIMPRQPLSNQFNTITAQGKKDPNQSSGMSIQRCTISANGNVI |
| SaPME37 | 1 | GTVDIFFGSAAVVFQGGCKIMPRQPLPRQFNTITAQGKKDPNQNSGMSIQRCISISGNVNT |
| SaPME45 | 1 | GTIDFIFGSAAVVFQDCKIMPRQPLGKQFNTITAQGKKDPNQNSGMSIQRCTISANGNVT  |
| SAPME39 | 1 | GTIDFIFGSAAVVFQDCKIMPRQPLGKQFNTITASGEERSNQNSGMSIQRCTISANGNVT  |

|         |    |            |
|---------|----|------------|
| AtPME1  | 61 | APTYLGRPWK |
| SaPME37 | 61 | APTYLGRPWK |
| SaPME45 | 61 | APTYLGRPWK |
| SAPME39 | 61 | APTYLGRPWK |

### ■ Deux clones ressemblant à AtPME 3 :

|         |   |                                                              |
|---------|---|--------------------------------------------------------------|
| SaPME8  | 1 | GTVDIFGNAAVVLQDCDIHARRPNSGQKNMVTQAQGRTRNQNTGIVIQKCRIGATSDLQ  |
| SaPME18 | 1 | GTVDIFGNAAVVLQDCDIHARRPNSGQKNMVTQAQGRTRNQNTGIVIQKCRIGATSDLQ  |
| AtPME3  | 1 | GTVDIFGNAAVVLQDCDIHARRPNSGQKNMVTQAQGRTRPNQNTGIVIQKCRIGATSDLQ |

|         |    |                 |
|---------|----|-----------------|
| SaPME8  | 61 | PVKSSFPTYLGRPWK |
| SaPME18 | 61 | PVKSSFPTYLGRPWK |
| AtPME3  | 61 | SVKGSFPTYLGRPWK |

### ■ Un clone ressemblant à AtPME 4 :

|        |   |                                                              |
|--------|---|--------------------------------------------------------------|
| AtPME4 | 1 | GTVDIFFGKSATVIQNTLIVVRKGSKGQYNTVTADGNEGLGGMKIGIVLQNCRIVPDRKL |
| Bp19   | 1 | GTVDIFFGKSATVIQNSLILCRKSGPGQTNHVTADGNEKGKAVKIGIVLHNCRIMADKEL |
| SaPME4 | 1 | GTVEFIFGKSATVIQNSLILIRKGSEGAHYVTADGNEKGAAVKIGIVLQNCRIMADKDL  |

|        |    |                   |
|--------|----|-------------------|
| AtPME4 | 61 | TPERLTVATYLGRPWKK |
| Bp19   | 61 | EADRLTVKSYLGRPWK- |
| SaPME4 | 61 | EADKLTSKSYLGRPWK  |

**Figure 41 :** alignements en acides aminés des clones SaPME ressemblant à AtPME 1, AtPME 3 et AtPME 4.

## ● Clonage dans le vecteur d'expression : pET-17b

Les vecteurs pMOS (ou pCR II) possédant les inserts SaPME 1, 3 et 4 ont été isolés, purifiés et restreints, en même temps que le vecteur pET-17b, avec les enzymes EcoR I et Xho I, correspondant aux sites de restriction que nous avons ajoutés aux amorces PCR. Après

purification par extraction du gel, les trois inserts ont été ligués dans pET-17b et les vecteurs pET-17b-SaPME 1, 3 et 4 ont été utilisés pour transformer des bactéries TOP 10 F'. Les clones positifs ont ensuite été séquencés (au départ de T7 promoter et T7 terminator, séquences spécifiques du vecteur pET-17b) (Fig. 42 et 43). Les vecteurs recombinants, isolés et purifiés, ont ensuite été insérés dans les bactéries BL21-DE3, permettant l'expression des protéines de fusion (T7tag-SaPME).

|        |     |                                                                |
|--------|-----|----------------------------------------------------------------|
| SaPME1 | 1   | GGAACCAATTGACTTTATCTTCGGAAACGCGCGGTGGTTTCCAAGACTGCAAGATCATG    |
| SaPME3 | 1   | GGAACCGTTGATTTTATATTTCGGAAACGCGCGCTCGTACTCCAAGACTGCGACATCCAC   |
| SaPME4 | 1   | GGTACAGTTGAATTTTATATTTCGGAAATCCGCGACAGTGATCCAAACTCTCTAATCCTC   |
| SaPME1 | 61  | CCAAGTACAGCCT--CTTGGGAAACAGTTCAACACCAATAACAGCTCAGGGGAA-GAAAGAT |
| SaPME3 | 61  | GCTCGCCGACCAAACTCCGGCCAAA--AACATGGTCACGGCACAGGAAG-GACTGAT      |
| SaPME4 | 61  | ATCCGAAAGGTAGCGAGGGACA-AGC-CCACTACGTTACAGCCGACGGTAACGAGAAAG    |
| SaPME1 | 118 | CCGAACCAAG--AACTCCGGCATGTCGATCCAGCGATGCA--CT-ATCTCCGCCAACGG--  |
| SaPME3 | 118 | CGTAACCAAG--AACACAGGGATTGTTATCCAAAATGTAGGCT-AGGTGCCACGTCGGAT   |
| SaPME4 | 119 | GTGCAGCGGTCAAGATCGGTATTGTTCTTCAGAACTGCCGTATCATGGCGGACAAAGACC   |
| SaPME1 | 171 | -----GAACGTGAC-----CGCTCCGA-CGTACCTAGGCGGCGGTGGAAAG            |
| SaPME3 | 175 | TTGCAAGCCGTGAAAAG-TAGCTTTCCGA-CATATCTTGGCCGCCATGGAAA           |
| SaPME4 | 179 | T---CAGAGTCAGCAAGCTAACAGCAATCTGACCTTGGACGTCCTTGGAAA            |

**Figure 42 :** alignement en bases des représentants de chacune des trois classes de PME identifiées chez Sinapis (les sites de restriction et les bases ajoutées ont été supprimés). Ces séquences sont celles qui ont été clonées dans le vecteur d'expression. SaPME 1 : 210 pb (N° accession : AY77003), SaPME 3 : 225 pb (N° accession : AY77004), SaPME 4 : 228 pb (N° accession : AY77005).

En tant que contrôle, nous avons transformé des bactéries BL21-DE3 avec le vecteur pET-17b sans insert. En effet, le vecteur pET-17b n'empêche pas l'expression basale (sans induction à l'IPTG) des protéines de fusion. Afin de pouvoir déterminer la bande protéique correspondante sur gel SDS-PAGE, il était nécessaire de pouvoir comparer avec les bandes protéiques issues de bactéries transformées par le vecteur seul (absence de la bande correspondant à la protéine de fusion). Après transformation, nous avons contrôlé par PCR (utilisant les amorces du vecteur, T7-p et T7-t), que les bactéries possédaient bien le vecteur sans insert.

|        |    |                                                                 |
|--------|----|-----------------------------------------------------------------|
| SaPME1 | 1  | GTIDFIFGSAVVFQDCKIMRQPLGKFNTITAQK-KDPNQNSGMSIQRCITISANGNV       |
| SaPME3 | 1  | GTVDFFFGNAVVLQDCDIHARRPNSGQKNMVTAGR-TDRNQNTGIVIQKCRIGATSDL      |
| SaPME4 | 1  | GTVEFFFGKSA TVIQNSLI LIRKGSEGAHYVTADGNEKGA AVKIGIVLQNCRI MADKDL |
| SaPME1 | 60 | T-----APT <del>YLGRPWK</del>                                    |
| SaPME3 | 60 | QPVKSSFPT <del>YLGRPWK</del>                                    |
| SaPME4 | 61 | EADKLTSKS <del>YLGRPWK</del>                                    |

**Figure 43** : alignement en acides aminés des représentants de chacune des trois classes de PME identifiées chez *Sinapis*. Ces séquences sont celles qui ont été clonées dans le vecteur d'expression. SaPME 1 : 210 pb (N° accession : AY77003), SaPME 3 : 225 pb (N° accession : AY77004), SaPME 4 : 228 pb (N° accession : AY77005).

Les clonages étant effectués, les trois protéines de fusion, T7tag-SaPME, peuvent être produites par les bactéries BL21-DE3, après induction à l'IPTG.

## Expression des protéines SaPME

### ● Courbe d'expression de l'insert

Nous avons tout d'abord réalisé une courbe d'expression de l'insert pour chacun des clones, indiquant que l'intensité d'une bande d'environ 15 kDa, correspondant à la taille attendue pour les inserts SaPME, augmente progressivement après induction à l'IPTG (résultats non présentés). Comme le vecteur pET-17b permet une expression basale des inserts même en absence d'IPTG, cette bande est également présente chez les bactéries non induites après une nuit de culture.

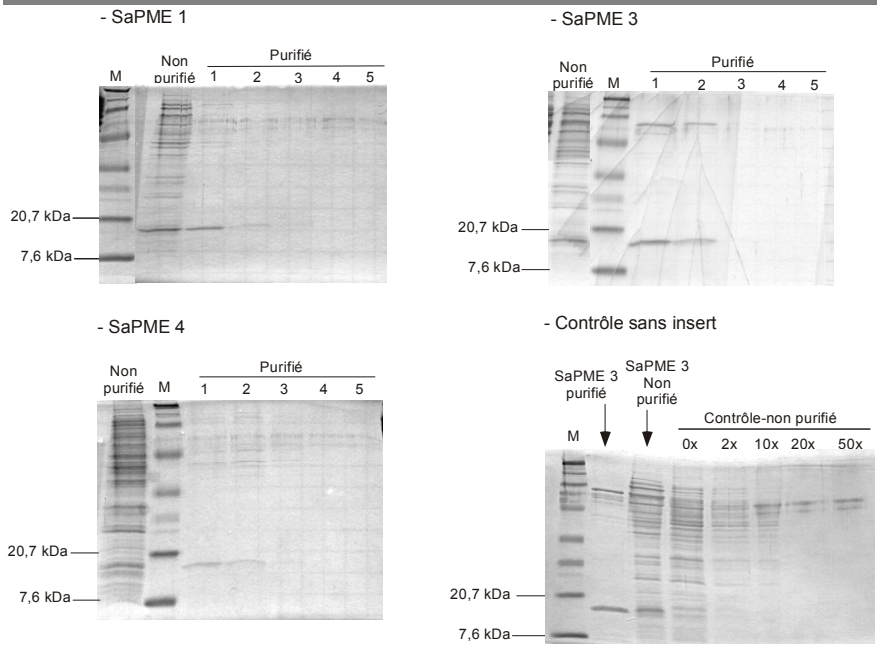
Les tout premiers résultats (non présentés) ne montrant pas une induction très importante des protéines de fusion, nous avons adapté les conditions de culture, comme conseillé dans le manuel du système pET pour les inserts pouvant être toxiques. Ceci, en augmentant la concentration en antibiotique, ce qui assure une meilleure stabilité du plasmide, et en utilisant du milieu TB (au lieu de LB), protégeant les bactéries de la lyse. Malgré ces précautions, nous n'avons pas pu obtenir une induction plus importante. Il semble que les quantités de

protéines produites par les bactéries dépendent principalement de la nature de l'insert. Certains, comme la sucrose synthase, produite au laboratoire, s'expriment très bien, et d'autres, comme les protéines SaPME, beaucoup moins. Cependant, il n'est pas nécessaire d'obtenir des concentrations très élevées de protéines pour l'immunisation des lapins.

## ● Purification sur colonne T7tag

Afin de pouvoir identifier de façon certaine les bandes correspondant aux inserts SaPME, nous avons réalisé une purification des protéines sur colonne T7tag.

La bande attendue ( $\approx 15$  kDa) ne se retrouve pas dans la fraction soluble (non présentée) mais bien dans l'insoluble (figure 44). On constate quelques autres bandes de poids moléculaire élevé, précipitant sur la colonne malgré l'utilisation de conditions dénaturantes. Par contre, les protéines des bactéries transformées avec le vecteur seul (contrôle sans insert) ne présentent pas la bande d'intérêt. Les bandes identifiées après purification sur colonne d'affinité T7tag correspondent donc bien à nos protéines de fusion, SaPME 1, 3 et 4.



**Figure 44 :** gel SDS-PAGE 15 % avec les produits issus de la purification de la fraction insoluble isolée des clones BL21-DE3/pET-17b/SaPME sur colonne d'affinité T7tag, et de la fraction insoluble des BL21-DE3 transformées avec le vecteur seul (contrôle). 1 à 5 : éluats de 1 ml chacun.

## Production des polysérums anti-PME

Une fois les fragments, correspondant à une zone conservée de PME de *Sinapis*, clonés dans le vecteur d'expression et insérés dans les bactéries permettant la production des protéines de fusion, celles-ci ont été purifiées et injectées séparément à des lapins. Les sérums obtenus après les divers rappels ont ensuite été caractérisés en Dot Blots et Western Blots.

La faible expression des protéines de fusion, ainsi que leur faible antigénicité ont amené de nombreuses difficultés pour l'obtention d'un polysérum suffisamment concentré et présentant une bonne réponse contre les PME. Plusieurs séries de rappels ont ainsi été nécessaires, avec des améliorations apportées à la purification des protéines, avant de pouvoir collecter définitivement les sérums. Nous ne détaillons ici que les techniques ayant donné les meilleurs résultats ainsi que la caractérisation finale des sérums.

## ● Purification des protéines SaPME et immunisation

En ce qui concerne la protéine SaPME 3, la technique permettant d'obtenir le matériel le plus pur possible pour l'immunisation des lapins était la purification sur colonne d'affinité T7tag. Cette technique a donné de bons résultats<sup>27</sup> pour l'isoforme SaPME 3 (Voir fig. 45 a) mais pas pour les deux autres.

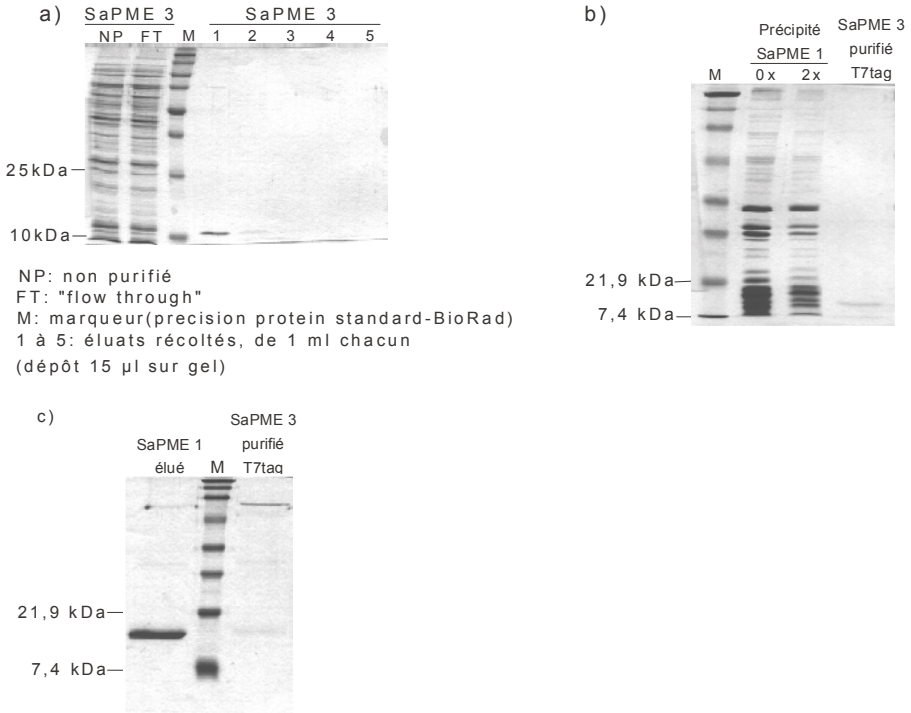
En effet, les extraits SaPME 1 et 4 précipitaient sur la colonne, ou avant même le dépôt sur la colonne. Nous les avons alors centrifugés et nous avons analysé le contenu en protéines des précipités T7tag. La figure 45 b montre le profil de migration des protéines présentes dans le précipité T7tag. On constate que la bande d'intérêt ( $\cong$  15 kDa - SaPME 1) est bien séparée des autres bandes. Les résultats obtenus pour SaPME 4 sont semblables.

Nous avons donc réalisé plusieurs extractions simultanées. Les précipités obtenus sont regroupés, concentrés sur des unités de filtration et déposés séparément sur grand gel SDS-PAGE pour élution de la bande d'intérêt. Les protéines éluées sont enfin analysées sur petit gel pour vérification de l'élution, et concentrées si nécessaire par précipitation à l'acétone. Les protéines ainsi purifiées et concentrées ont enfin été mélangées (V/V) à un adjuvant, le Quil A, afin de stimuler la réponse immunitaire, et injectées à des lapins.

La figure 45 c montre les quantités de protéines éluées que l'on peut obtenir avec cette technique. On constate que les protéines SaPME ainsi éluées sont très pures et en concentration importante. Nous avons également vérifié par Western Blot utilisant l'anticorps anti-T7tag de Novagen que la bande éluee correspondait bien à notre protéine de fusion (résultats non présentés).

---

<sup>27</sup> Notons ici que pour obtenir de bons résultats avec cette technique, il était nécessaire de réaliser la culture des bactéries, l'induction à l'IPTG, l'extraction et la purification des protéines sur colonne T7tag le même jour, sans congélation des extraits ni stockage à 4 °C.

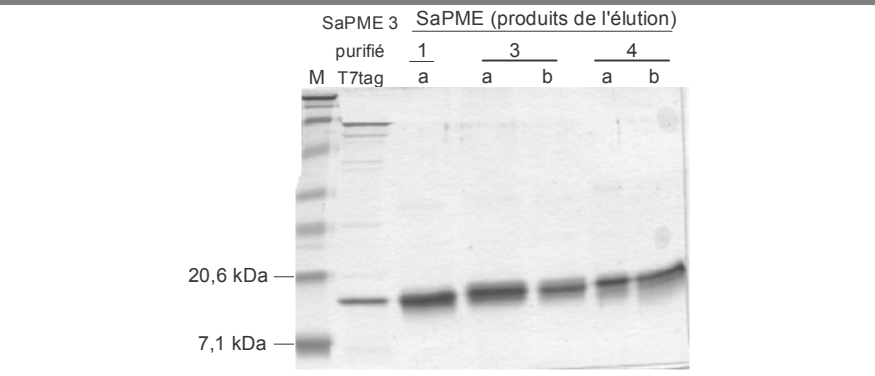


**Figure 45:** (a) gel SDS-PAGE 12 % avec les produits issus de la purification de la fraction insoluble isolée du clone SaPME 3 sur colonne d'affinité T7tag. 1 à 5 : éluats de 1 ml chacun. (b) Gel SDS-PAGE (12 %) montrant le contenu protéique du précipité T7tag (SaPME 1) – dépôt 15  $\mu$ l. La bande d'intérêt est repérée par comparaison avec la protéine SaPME 3 purifiée sur colonne T7tag. (c) Gel SDS-PAGE 12 % avec les produits d'une élution – clone SaPME 1 (les 4 précipités provenant des 4 extractions simultanées sont concentrés et déposés sur grand gel. La bande d'intérêt est découpée et éluee).

Ces conditions ont été utilisées pour les trois derniers rappels. La première immunisation et les rappels précédents ont été effectués à partir de protéines purifiées sur colonne T7tag (voir Fig. 44) ainsi qu'à partir de protéines extraites de cultures de bactéries à grande échelle (1L). Ces extraits étaient déposés sur grands gels SDS-PAGE, les bandes d'intérêts étaient ensuite découpées, éluées des gels, et enfin concentrées si nécessaire.

La figure 46 montre les résultats obtenus avec cette technique. La difficulté résidait dans l'obtention d'une bonne séparation des bandes sur gel et donc dans l'isolement de la protéine d'intérêt des autres

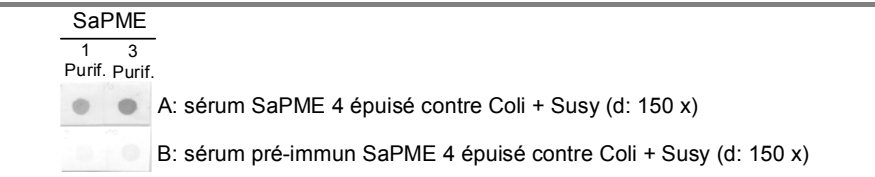
protéines bactériennes, ainsi que dans la concentration finale en protéines, souvent faible.



**Figure 46 :** bandes obtenues sur gel SDS-PAGE (12 %) après électroélution et après purification sur colonne T7tag des protéines provenant des clones BL21-DE3/pET-17b/SaPME.

● Caractérisation des sérums

Les sérums obtenus après les divers rappels ont ensuite été caractérisés en Dot Blots et Western Blots. Après le 4<sup>ème</sup> rappel, nous observions une réponse des sérums SaPME - préalablement épuisés contre des protéines provenant des mêmes bactéries possédant le même vecteur mais un autre insert (sucrose synthase – Susy) - contre les protéines de fusion, mais également contre des protéines pariétales de *Sinapis* présentant une activité PME, ainsi que contre des PME commerciales de *citrus* (Sigma) (résultats non présentés). Enfin, ces tests ont également permis de montrer que les différents sérums croisent entre eux (Fig. 47).



**Figure 47 :** Dot Blot (anticorps secondaire couplé à la peroxydase) analysant la réponse croisée du sérum provenant d'un lapin immunisé avec l'isoforme SaPME 4 (A – lapin SaPME 4a), contre les protéines SaPME 1 et 3 purifiées sur colonne T7tag, en comparaison avec le sérum du même lapin non encore immunisé (B).



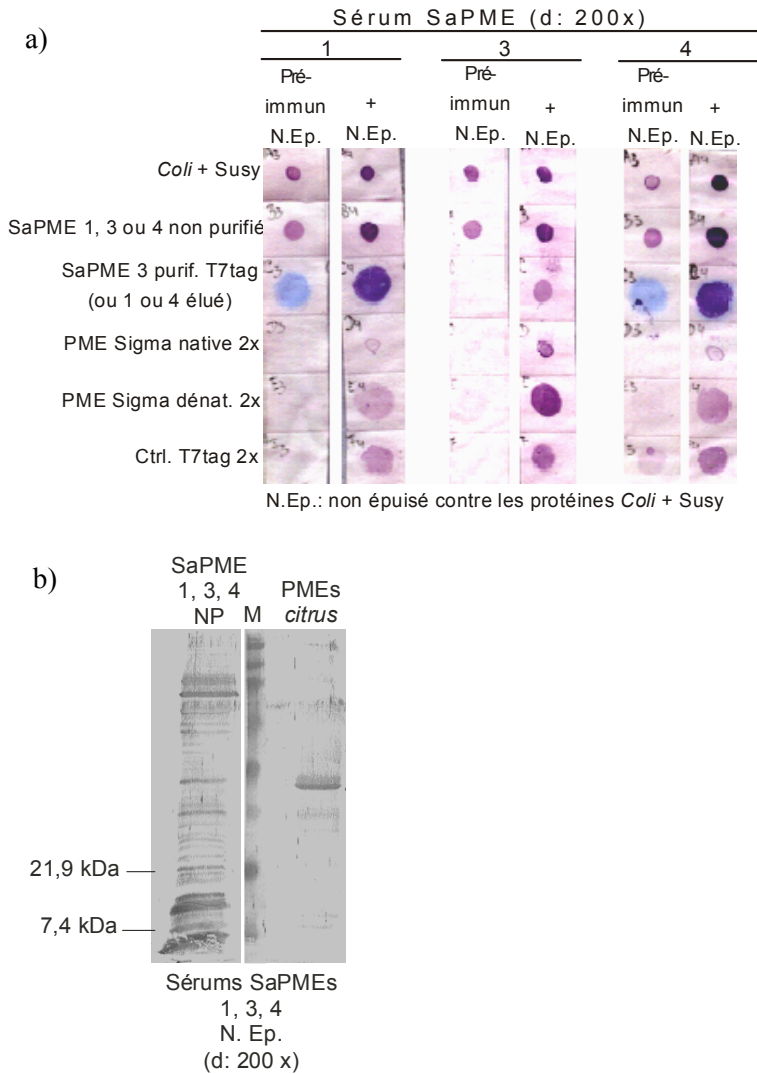
Cependant, à ce stade, les titres des anticorps étant encore assez faibles (dilution de 150 x), il était nécessaire de ré-immuniser quelques fois. Nous avons donc réalisé trois nouveaux rappels. Malheureusement, les rappels 5 à 7 n'ont pas permis d'augmenter les titres des anticorps, ce qui nous a poussé à revoir nos méthodes de purification et de concentration des protéines antigéniques. Les trois derniers rappels ont permis l'augmentation des titres en anticorps spécifiques (dilution de 200 x).

La figure 48 montre les résultats de l'analyse séparée des sérums prélevés après l'avant dernier rappel en Dot Blot, ainsi que celle en Western Blot des sérums SaPME 1, 3 et 4 en mélange, obtenus après le dernier rappel<sup>28</sup>.

On constate que tous les polysérums provenant des lapins immunisés sont capables de reconnaître les protéines antigéniques purifiées ou non, ainsi que des PME d'orange natives ou dénaturées, par rapport aux sérums pré-immuns. On observe également que les sérums présentent une réponse contre la partie T7tag de la protéine de fusion et une forte réponse contre des protéines d'*E. coli*. (Fig. 48 a). En Western Blot, la réponse des sérums en mélange contre la PME d'orange est bien visible, ainsi que la réponse contre la protéine de fusion dans l'extrait total (Fig. 48 b).

Afin d'éliminer la réponse de nos sérums contre des protéines non spécifiques, ainsi que contre la partie T7tag des protéines de fusion, l'épuisement total des sérums contre des protéines provenant des mêmes bactéries (*E. coli* – BL21-DE3), transformées avec le même vecteur (pET-17b) mais possédant un autre insert (sucrose synthase – Susy) est indispensable.

<sup>28</sup> Ces tests analysent les réponses des lapins SaPME 1b, SaPME 3b et SaPME 4a, les lapins SaPME 1a et SaPME 4b étant morts. Le lapin SaPME 3a montrant une moins bonne réponse, nous ne présenterons que les résultats obtenus avec le sérum du lapin SaPME 3b.

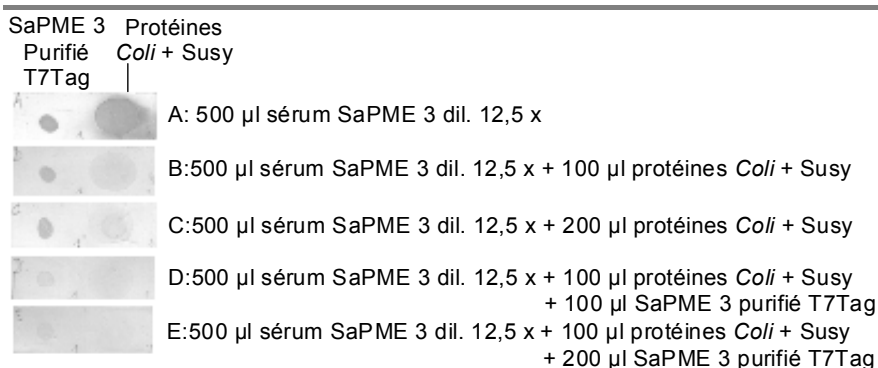


**Figure 48:** (a) Dot Blot (anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline) analysant les sérums (prélevés après le 9<sup>ème</sup> rappel) provenant des lapins immunisés avec les isoformes SaPME 1, 3 ou 4 utilisés séparément en comparaison avec ceux provenant des mêmes lapins non encore immunisés. Les spots bleus sur les languettes des sérums SaPME 1 et 4, pré-immuns - N.Ep. sont dus au bleu de Coomassie présent dans les protéines SaPME 1 et 4 éluées. (b) Western Blot (anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline) analysant la réponse des sérums SaPME 1, 3 et 4 non épuisés contre les protéines E. coli + Susy, contre les protéines SaPME 1, 3 et 4 non purifiées (NP) et les PME de citrus.

Le sérum SaPME 3 étant celui présentant la meilleure réponse, et les différents sérums montrant des réactions croisées, nous avons choisi de n'utiliser que ce polysérum seul pour réaliser les tests de marquage et d'inhibition.

## □ Épuisement et inhibition

Afin de pouvoir épuiser totalement le polysérum contre des protéines de *E. coli* + Susy, nous avons tout d'abord produit ces protéines en grandes quantités et sous forme très concentrée<sup>29</sup>, comme décrit dans le « Matériel & méthodes ». En utilisant ces protéines sans dilution préalable, nous sommes parvenus à un épuisement total de la réponse *E. coli* + Susy du polysérum SaPME 3, même aux faibles dilutions utilisées, comme le montre le Blot de la figure 49, lignes B et C. Nous arrivons de plus à éteindre la réponse contre SaPME 3 par incubation avec cette même protéine purifiée sur colonne d'affinité T7tag (figure 49, lignes D et E).

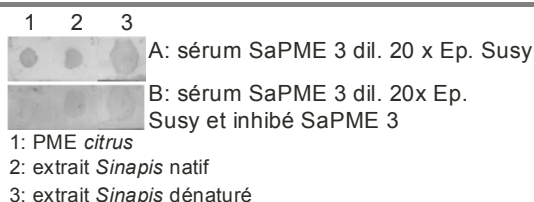


**Figure 49 :** Dot Blot (anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline) analysant l'extinction de la réponse aspécifique du sérum SaPME 3 après épuisement total contre les protéines *E. coli* + Susy, ainsi que l'inhibition de la réponse spécifique contre SaPME 3 après par pré-incubation avec l'antigène purifié.

<sup>29</sup> Les protéines d'épuisement utilisées lors des tests intermédiaires étaient toujours diluées de 50 à 100 x ce qui limitait les quantités que l'on pouvait ajouter au polysérum et ne permettait pas d'obtenir un épuisement total, même si celui-ci était important.

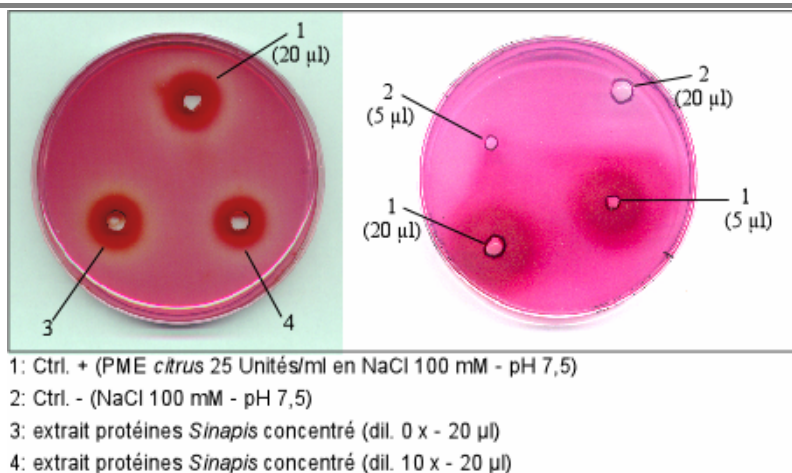
## □ Détection de PME sur des extraits de protéines totales de *Sinapis*

Nous avons ensuite vérifié que le polysérum SaPME 3 épuisé était capable de reconnaître spécifiquement des PME dans des extraits de plantes entières de *Sinapis*, natifs ou dénaturés (figure 50). La réponse est fortement réduite après inhibition du polysérum par incubation avec son antigène purifié, ce qui prouve sa spécificité.



**Figure 50 :** Dot Blot (anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline) analysant la réponse du polysérum SaPME 3 épuisé contre des extraits de protéines totales de *Sinapis*, natives et dénaturées, ainsi que l'extinction de cette réponse après pré-incubation avec l'antigène purifié.

Le test d'activité présenté sur la figure 51 indique la présence d'une forte activité PME dans ces extraits.

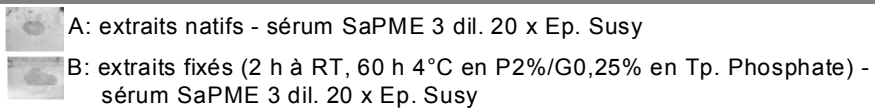


**Figure 51 :** Test de la présence d'une activité PME dans les extraits de protéines totales de *Sinapis*.

L'extrait est déposé dans des puits creusés sur gel agar-pectine estérifiée. Après migration par diffusion dans le gel, l'activité PME est mise en évidence par l'ajout de rouge de ruthénium, un colorant

chargé positivement qui se fixe ioniquement aux zones du gel qui ont été déséstérifiées par les PME, présentant ainsi des charges négatives.

Enfin, nous avons vérifié que la reconnaissance de ces extraits par le polysérum n'était pas altérée par une fixation préalable. La reconnaissance des PME végétales, après fixation 2 h à RT et 60 h à 4°C en paraformaldéhyde 2 % (P 2 %), glutaraldéhyde 0,25 % (G 0,25 %) en Tp. Phosphate et immobilisation sur membrane de nitrocellulose, n'est pas altérée par rapport à la reconnaissance de PME non fixées (Fig. 52). Cependant, ceci n'est qu'une indication car l'analogie avec un tissu n'est qu'imparfaite.



**Figure 52:** Dot Blot (anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline) analysant la capacité du polysérum SaPME 3 épuisé à reconnaître des protéines présentes dans les extraits de *Sinapis* lorsqu'ils sont fixés selon la même technique que celle utilisée sur coupes de méristèmes.

---

Les trois polysérums sont donc spécifiques des PME, capables non seulement de reconnaître des PME commerciales de *Citrus* (Sigma) mais aussi des protéines pariétales extraites de feuilles de *Sinapis*, qui présentent une activité PME, qu'elles soient sous forme native ou dénaturée. Comme ils croisent entre eux, nous avons sélectionné le sérum SaPME 3, présentant la meilleure réponse. Les titres des anticorps spécifiques ont été augmentés au maximum en ré-immunisant les lapins avec les protéines antigéniques purifiées de la meilleure façon possible. La réponse immunitaire dépendant principalement de l'antigénicité de la protéine (Balangé, communication personnelle) et non du nombre d'injections, il était inutile de faire plus de rappels aux lapins.

---

## Utilisation des polysérums en immunocytochimie

---

Nous avons pu obtenir un marquage en immunocytochimie, avec le polysérum SaPME 3 totalement épuisé contre les protéines *E. coli* + Susy, sur tissus frais ou légèrement fixés, mais non inclus en résine LRW. Ce qui permet d'éviter toute réduction de l'antigénicité ou de l'accessibilité par la fixation et/ou les traitements préalables à l'inclusion en résine LRW.

Les résultats sont présentés ci-dessous.

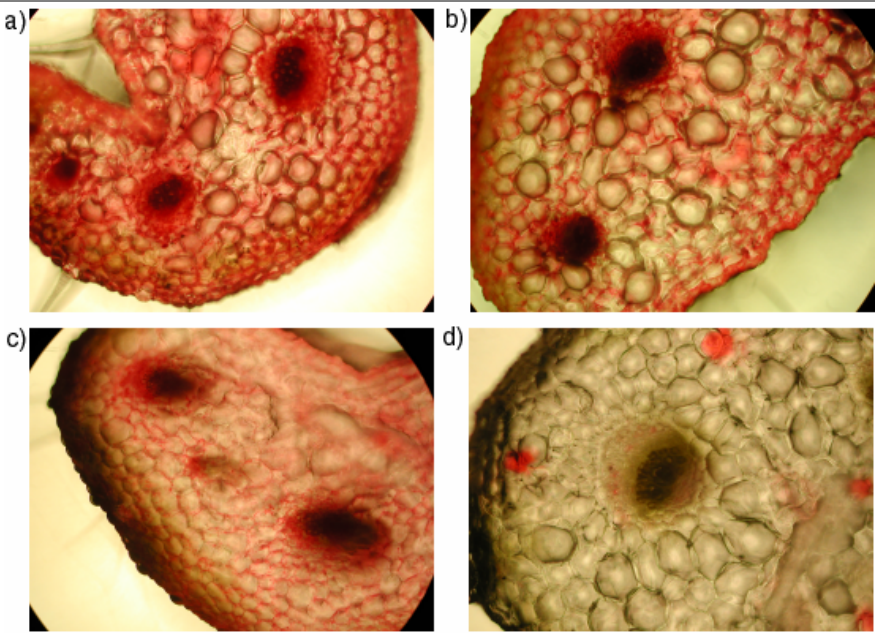
Malheureusement, tous les essais réalisés sur coupes incluses en résine LRW se sont révélés infructueux. Nous n'obtenions aucun marquage, excepté au niveau des trachéides et des cellules de la gaine fibreuse, ainsi qu'au niveau des épidermes de certains tissus, mais sans pouvoir démontrer leur spécificité par des tests d'inhibition.

Nous avons testé différentes fixations, de plus en plus douces, ainsi que différentes méthodes de marquage. En plus des tests sur des méristèmes apicaux (végétatifs et induits), nous avons également tenté l'analyse sur d'autres tissus, susceptibles de contenir de plus grandes quantités de PME (les pectines de l'apex étant largement estérifiées). Nous avons en outre essayé de démasquer les sites antigéniques par divers traitements, toujours sans succès.

Enfin, comme les sérums utilisés étaient juste épuisés contre des protéines d'*E. coli* + Susy, mais non purifiés par affinité contre leur antigène, nous avons testé différentes méthodes de purification et de concentration des IgG spécifiques. Bien que nous ayons pu récolter des quantités suffisantes d'anticorps spécifiques pour les tests en Dot Blots et Western Blots, nous n'avons pu obtenir aucun marquage sur coupes.

La figure 53 (a, b) montre que le polysérum SaPME 3, épuisé contre les protéines *E. coli* + Susy, donne un signal sur coupes à main levée de pétioles, fixées 2 h à RT puis une nuit à 4°C en paraformaldéhyde 2 % ou de la même façon en paraformaldéhyde 2 % - glutaraldéhyde 0,25 %,

mais non incluses en résine LRW. On ne retrouve pas ce signal sur les contrôles de l'anticorps secondaire, réalisés sur tissus fixés deux heures à RT puis une nuit à 4°C en paraformaldéhyde 2 % (Fig 53 d). Par contre on constate que le marquage semble altéré après une fixation plus longue<sup>30</sup>, 2 h à RT puis 60 heures à 4°C en paraformaldéhyde 2 % - glutaraldéhyde 0,25 % (Fig. 53 c).

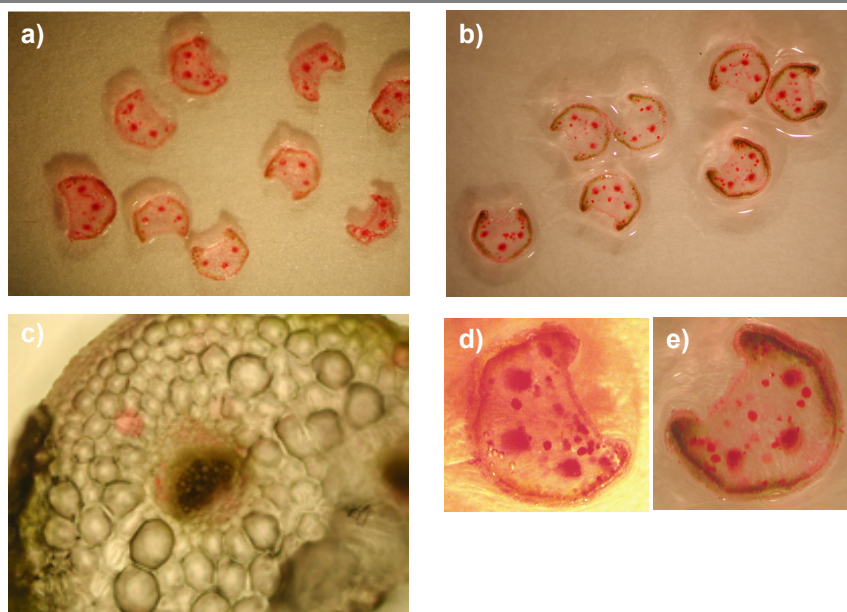


**Figure 53 :** marquage avec le polysérum SaPME 3 (dil. 15 x) épuisé sur coupes à main levées de pétioles faiblement fixés de *Sinapis* (G: 100 x): (a) fixation 2 h à RT puis 1 nuit à 4°C en P 2 %. (b) fixation 2 h à RT puis 1 nuit 4°C en P 2 % - G 0.25 %. (c) fixation 2 h à RT puis 60 h à 4°C en P 2 % - G 0.25 %. (d) contrôle de l'anticorps secondaire (tissu fixé en P 2 % - 2 h à RT puis une nuit à 4°C).

<sup>30</sup> Cette fixation longue est celle utilisée pour les méristèmes apicaux analysés avec l'anticorps 2F4 en microscopie confocale. Ayant été utilisée avec succès par Christensen *et al.* (1998) pour la détection de PME, nous l'avons choisie en vue de l'utilisation des mêmes échantillons pour les marquages avec le 2F4 et le polysérum SaPME.

L'observation au binoculaire montre une nette différence de marquage entre les pétioles (non fixés) marqués avec le polysérum SaPME 3 épuisé (Fig. 54 a) ou épuisé et inhibé contre SaPME 3 (Fig. 54 b), surtout au niveau des épidermes.

Un détail de ces images est présenté figures 54 d et e. Le contrôle de l'anticorps secondaire est bien négatif (Fig. 54 c).



**Figure 54 :** marquage avec le polysérum SaPME 3 épuisé (dil. 30 x) sur coupes à main levée de pétioles frais de *Sinapis* (a, d) ainsi qu'avec ce polysérum épuisé et inhibé contre l'antigène purifié (SaPME 3 purifié T7tag)(b, e). (c) Contrôle de l'anticorps secondaire (tissu frais). Observation au binoculaire (a, b : G 10 x ; c : G 100 x).

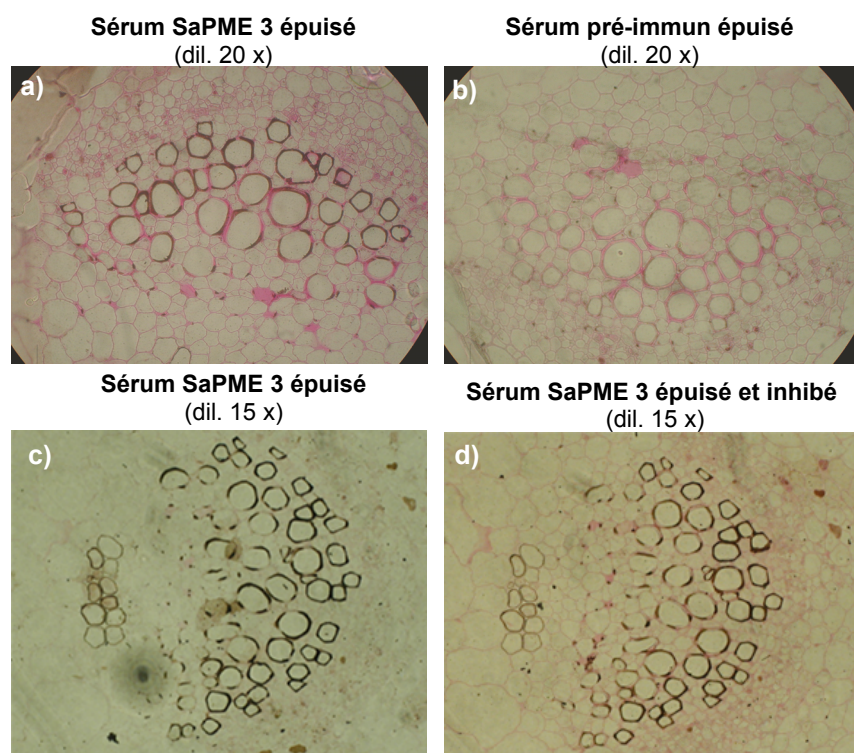
Par contre, le marquage au niveau des faisceaux conducteurs persiste même après inhibition, ce qui est une indication de son aspécificité. Certains glycoconjugués, comme les AGP (arabinogalactan proteins) sont capables de lier des IgG. Ces macromolécules sont impliquées dans un rôle d'adhésifs naturels à la surface des cellules végétales. Ces AGP sont communes dans les tissus vasculaires des plantes et leur présence pourrait expliquer la fixation non spécifique d'IgG, fréquemment associées à ces



tissus. De plus, les polyphénols peuvent aussi lier des protéines et des glycoprotéines telles que des immunoglobulines (Knox, 1982).

Guglielmino *et al.* (1997 a), ont pourtant détecté la présence d'une activité PME dans les tissus conducteurs du peuplier. Quentin *et al.* (1997) ont également montré que les vaisseaux xylémiens de l'hypocotyle de lin étaient reconnus spécifiquement par le polysérum anti-PME de Mareck *et al.* (1995), avec cependant une surestimation du marquage, due à la fois à de l'autofluorescence de ces tissus mais aussi à la fixation non spécifique d'IgG en ces endroits. Ce signal pourrait donc être composé d'un mélange de marquage spécifique et non spécifique (principalement), impossible à éteindre par inhibition du sérum avec l'antigène en raison de la présence d'IgG non spécifiques présents même après épuisement total contre les protéines *E. coli* + Susy.

Ceci est soutenu par les résultats obtenus sur coupes de pétioles de *Sinapis* fixés de façon douce et inclus en LRW. On observe en effet une intense différence de signal entre le marquage avec le polysérum SaPME 3 épuisé et le sérum pré-immun épuisé (figure 55 a, b). Cependant, comme pour les tissus frais, les tests d'inhibition n'ont pas permis d'éteindre ce signal et de démontrer sa spécificité (figure 55 c, d). La question reste donc ouverte.



**Figure 55 :** (a, b) marquage observé avec les sérums SaPME 3 (épuisé - dil. 20x) et pré-immuns (épuisé - dil. 20x)(G: 200)x sur pétioles de *Sinapis* fixés en paraformaldéhyde 2 % - Glutaraldéhyde 0,25% 2 h à RT puis 1 nuit à 4°C. (c, d) Test d'inhibition du marquage observé avec le sérum SaPME 3 épuisé au niveau des trachéides et des cellules de la gaine fibreuse (G : 200 x). (c) Marquage obtenu avec le polysérum SaPME 3 épuisé (dil. 15 x) sur coupes de pétioles de *Sinapis* fixés 2 h à RT puis une nuit à 4°C en paraformaldéhyde 2 %.(d) Marquage obtenu avec le polysérum SaPME 3 (dil. 15 x) épuisé et inhibé contre la protéine SaPME 3 sur coupes de pétioles de *Sinapis* fixés 2 h à RT puis une nuit à 4°C en paraformaldéhyde 2 %.

## ■ Discussion générale et conclusions

Nous avons donc produit un anticorps polyclonal reconnaissant des PME de *Sinapis* et d'autres plantes. Ce polysérum a été caractérisé et nous avons tenté de l'utiliser pour l'immunocytochimie. Malheureusement, nous n'avons pu obtenir un marquage que sur tissus frais ou légèrement fixés, les fixations fortes et/ou les traitements préalables à l'inclusion en résine LRW réduisant probablement l'antigénicité ou l'accessibilité des PME. Une alternative serait la technique des coupes à congélation, que nous n'avons pas testée, et qui permet de ne fixer que très peu les tissus, sans inclusion en résine. Cependant, il n'est absolument pas garanti que cela puisse fonctionner en raison des problèmes de perte de l'antigène par solubilisation qui sont fréquemment rencontrés avec cette technique (Brandtzaeg, 1982). De plus, la perspective d'une analyse sur tissu frais n'est pas envisageable pour des tissus aussi petits que le méristème apical.

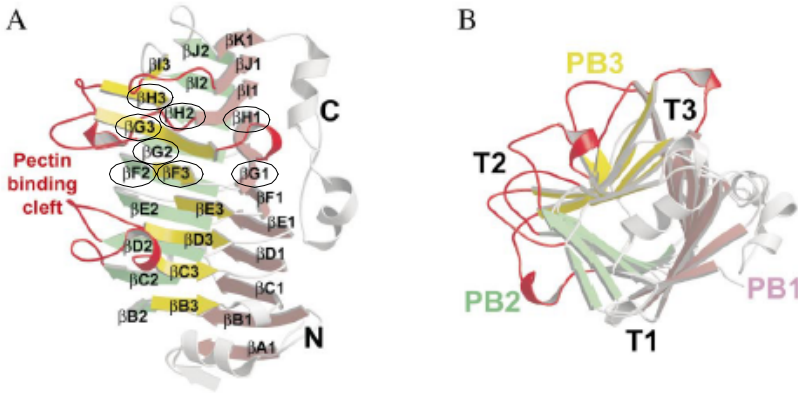
Toutefois, l'**observation d'un signal spécifique au niveau des épidermes sur tissus frais** est en accord avec les résultats obtenus avec le polysérum anti-PME de Mareck *et al.* (1995). Même si le marquage des PME s'est avéré être distribué dans toutes les parties de l'hypocotyle de lin, il n'était cependant pas homogène et apparaissait renforcé dans la zone apicale ainsi qu'au niveau de l'épiderme, ce dernier apparaissant plus marqué que les tissus internes. Alexandre *et al.* (1997) ont également détecté la présence d'une intense activité PME (65 % de l'activité totale) au niveau de l'épiderme d'hypocotyles de lin. Selon ces auteurs, l'épiderme contrôle l'élongation de la plante entière et les isoformes spécifiques de ce tissu pourraient jouer un rôle dans l'acidification des pectines au cours de la phase de maturation de l'hypocotyle (diminution du degré d'estérification).

D'autre part, nos amorces permettant l'amplification de PME végétales sont très couramment utilisées au laboratoire. Ce sont les seules ayant permis l'amplification d'ADNc de fraises en maturation, ainsi que de PME de chicorées.

Malgré l'injection de protéines les plus pures possibles, nous n'avons pu augmenter les titres en anticorps spécifiques. Il semble en effet que les titres que l'on peut obtenir dépendent beaucoup de la nature de la protéine (nombre d'épitopes possibles, capacité antigénique de chacun) (PA. Balangé, communication personnelle). De plus, comme les titres peuvent être très différents selon l'animal, nous avons choisi d'utiliser deux animaux par protéine recombinante, mais les différences entre les lapins étaient faibles. L'utilisation de Quil A comme adjuvant a été choisie notamment pour le bien-être des animaux, mais également parce que les résultats habituellement obtenus avec cet adjuvant sont très bons (Sjölander *et al.*, 1997; Rönnberg *et al.*, 1997). Toutefois la concentration de nos polysérums à laquelle on observe encore un signal contre les PME citrus devrait être théoriquement suffisante pour permettre la détection en immunocytochimie (PA. Balangé, communication personnelle).

Il semble donc qu'il s'agisse plus d'un problème d'affinité que de titres en anticorps spécifiques. Lorsque nous avons commencé nos travaux, aucune publication concernant la structure des PME n'était encore disponible. La publication de la structure tridimensionnelle de la PME d'*Erwinia chrysanthemi* n'ayant paru qu'en 2001 (Jenkins *et al.*, 2001), et celle de la première PME végétale en 2002 (Johansson *et al.*, 2002). La structure de cette PME de carotte a été décrite dans le Relevé de Littérature.

L'organisation en  $\beta$ -prisme consiste en trois feuillets  $\beta$  parallèles, PB1, PB2 et PB3. Les tours entre les rangs de PB1-PB2, PB2-PB3, et PB3-PB1 sont appelés T1, T2 et T3, respectivement (voir figure 56 A, B). La PME de carotte a huit tours en  $\beta$ -hélice régulière avec des rangs dans chacun des trois feuillets.



**Figure 56** : structure d'une PME de carotte. A : la PME de carotte possède une structure en  $\beta$ -hélice constituée de trois feuillets  $\beta$  parallèles organisés de façon prismatique. Les feuillets PB1, PB2 et PB3 sont colorés en brun, vert et jaune, respectivement. Les rangs sont numérotés de  $\beta A1$  à  $\beta K1$  dans le feuillet PB1,  $\beta B2$  à  $\beta J2$  pour le feuillet PB2 et  $\beta B3$  à  $\beta I3$  pour le feuillet PB3. Les boucles formant le sillon de liaison à la pectine sont colorés en rouge ; les parties ne participant pas aux feuillets  $\beta$  sont blanches. B : vue de la structure en A ayant subi une rotation de  $90^\circ$  autour de l'axe x, observée du côté N-terminal. Les couleurs employées sont les mêmes qu'en A. La localisation de PB1, PB2 et PB3 ainsi que des boucles entre les feuillets, nommées T1, T2 et T3, est indiquée.

Les rangs entourés sur la figure 57 A correspondent aux rangs incorporés dans la zone que nous avons clonée. Nous les avons déterminés d'après la séquence en acides aminés de la PME de carotte présentée dans le « Relevé de Littérature » (figure 15). On constate que tous ces rangs sont très proches du sillon de liaison à la pectine. Seuls deux de ces rangs font partie du feuillet PB1, le plus régulier et le plus éloigné du sillon, pour 6 rangs faisant partie des feuillets PB2 et PB3 plus distordus et très proches du sillon de liaison à la pectine. En plus de ces rangs, la séquence que nous avons clonée comporte bien sûr quelques tours intermédiaires, mais quoiqu'il en soit, presque toute cette séquence se trouve en réalité à proximité du sillon, ou en fait partie. Ce qui pourrait expliquer le fait que l'on n'ait pas pu obtenir de marquage sur coupes. En effet, les PME présentes sur coupes sont associées à la paroi et donc à la pectine.

La zone reconnue par notre polysérum étant presque entièrement masquée par cette association entre la protéine et son substrat. Par contre sur Blot, la protéine s'adsorbe par n'importe quel côté et la reconnaissance doit être meilleure. De plus, l'inclusion en résine LRW

ainsi que la fixation des tissus, doivent encore réduire l'accessibilité des anticorps aux PME, qui est probablement déjà faible sur tissus frais.

La figure 57 montre, en jaune, la séquence sur la PME de carotte en trois dimensions, correspondant à la zone que nous avons clonée. L'orientation de la protéine est identique à celle de la figure 56 A. On constate que la partie supérieure du sillon de liaison à la pectine, en rouge sur la fig. 56 A, correspond presque entièrement à la zone que nous avons amplifiée, en jaune sur cette image.

Le manque d'accessibilité des anticorps spécifiques à cette partie de la protéine, notamment en raison de sa liaison avec son substrat, semble donc bien être l'hypothèse la plus probable pouvant expliquer l'incapacité de notre polysérum à détecter des PME, sur tissus inclus en résine LRW.

---



---

**Figure 57 :** structure en trois dimensions de la PME de carotte (Johansson et al., 2002). La région correspondant à celle amplifiée à partir du génome de *Sinapis* est allumée en jaune sur l'image (NCBI – PubMed).

# Conclusions & Perspectives





Au cours de notre travail, nous avons entrepris l'analyse immunocytochimique des pectines du SAM d'une plante photopériodique, *Sinapis alba*, aussi bien en conditions végétatives que lors de la transition vers la production de fleurs. Nous avons utilisé l'anticorps monoclonal 2F4, reconnaissant un épitope des homogalacturonanes sous leur conformation en « boîte à œufs », induite par le calcium (Liners *et al.*, 1989).

Nous sommes partis de l'hypothèse que les pectines du SAM étaient susceptibles de subir de profonds remaniements lors d'un phénomène de développement aussi important que le passage de la formation de structures végétatives à des structures florales. Notre étude a amplement permis de confirmer cette hypothèse, tout en apportant d'importantes données en ce qui concerne la nature et la localisation des pectines dans le SAM végétatif, permettant une meilleure compréhension de l'architecture des parois de ce site essentiel pour les processus de morphogenèse.

### **Nature et localisation des pectines dans le SAM végétatif**

L'analyse des pectines dans le SAM de plantes végétatives a montré qu'il existe très peu de pectines acides, reconnues par l'anticorps 2F4, dans les parois des cellules méristématiques, bien que leurs concentrations augmentent dans les tissus sous-jacents en différenciation. Les pectines sont largement estérifiées par des groupements méthyles, acétyles et/ou par d'autres esters, et sont présentes en plus grandes quantités dans les zones de jonction intercellulaires. La forte adhésion observée entre cellules méristématiques ne dépend donc pas de la présence de gels calciques mais semble faire intervenir d'autres types de liens. L'absence de gels calciques au niveau des plasmodesmes indique également que ces microdomaines sont consolidés par d'autres types de liens. La question de l'importance de la contribution de ce type de gels à l'adhésion cellulaire est donc, à l'instar d'autres auteurs (Liners *et al.*, 1992 ; Bush & McCann, 1999 ; Bush *et al.*, 2000 ; Mollet *et al.*, 2000), à nouveau soulevée.

## ***Modification des pectines au cours de la transition florale***

---

Lors des premières étapes de la transition florale, entre la 12<sup>ème</sup> et la 20<sup>ème</sup> heure après le début du JL, soit bien avant la formation des structures reproductrices, nous avons observé une réduction considérable de la quantité d'acides polygalacturoniques estérifiés dans les parois méristématiques. Cette modification des pectines semble ne concerner que la zone méristématique. La sensibilité de la technique d'intensification à l'argent en microscopie confocale a permis de montrer que le peu de pectines acides présentes dans les parois méristématiques semble également touché par cette dégradation, et probablement de façon plus importante dans la tunica.

Ce remaniement des pectines pourrait être impliqué dans l'établissement de communications spécifiques entre les cellules du méristème (Ormrod & Bernier, 1990 ; Bradley *et al.*, 1996 ; Ormenese *et al.*, 2000, 2002), ou encore préparer la paroi aux ajustements nécessaires pour les changements liés au développement floral. De plus, la dégradation des pectines provoque inévitablement la libération de fragments pectiques au niveau de l'apex. De tels fragments pouvant jouer le rôle de signaux à courte (Ridley *et al.*, 2001) ou longue distance (Rigby *et al.*, 1994 ; Iwai *et al.*, 2003) dans de nombreux processus de développement, nous pouvons nous interroger sur leur implication dans l'induction florale chez *Sinapis*. Après 48 heures, l'apex semble retrouver un contenu normal en pectine, mais celle-ci est majoritairement estérifiée par d'autres esters que des méthylesters.

Des enzymes pectolytiques, comme la pectine méthylestérase, doivent être impliquées dans cette dégradation des pectines de l'apex. C'est pourquoi nous avons produit un polysérum dirigé contre une zone conservée des PME. Malheureusement, la faible affinité des anticorps spécifiques pour leur antigène, ajoutée à un manque d'accessibilité aux enzymes liées à la paroi empêche l'analyse immunocytochimique. Ce polysérum est toutefois capable de reconnaître spécifiquement des PME dans des extraits végétaux, ainsi que sur tissus non inclus en résine LRW.

---

Nous avons ainsi pu observer un marquage spécifique au niveau des épidermes de pétioles de *Sinapis*.

### ***Intégration des routes moléculaires et physiologiques de la transduction du signal de floraison***

---

La transduction du signal lumineux (JL) permettant la transition de l'état végétatif à l'état floral peut être décomposée en un réseau d'événements impliquant des voies moléculaires, biophysiques et biochimiques. Des interactions entre ces différentes voies sont nécessaires durant tout le processus. Cependant, ces dernières sont en grande partie inconnues.

La figure 58 met en parallèle les voies moléculaires, principalement déterminées chez *A. thaliana*, et physiologiques. Elle permet d'intégrer nos observations avec le contrôle génétique de la floraison et les autres événements de la transition florale observés chez *S. alba*.

Les quelques gènes correspondant à des gènes de floraison d'*Arabidopsis* et identifiés chez *Sinapis* sont également indiqués sur le schéma : *SaMADS A, B, C* et *D* (Melzer *et al.*, 1995 ; Menzel *et al.*, 1996 ; Bonhomme *et al.*, 1997, 2000) et *SaCO*, *SaLFY* (non publiés).

#### ► Contrôle génétique de la floraison chez *A. thaliana*.

Brièvement, le contrôle génétique de la floraison chez *A. thaliana* fait intervenir quatre types de gènes : les gènes de la période de floraison (rouge), les gènes d'identité du méristème inflorescentiel (vert) (*TFL 1* : *TERMINAL FLOWER 1* et *AGL 8* : *AGAMOUS-LIKE 8* notamment), les gènes d'identité du méristème floral (orange) et les gènes d'identité des organes (violet).

La période de floraison, nous intéressant plus particulièrement, est principalement contrôlée par trois voies plus ou moins indépendantes (Bernier *et al.*, 2002).

- **La voie de promotion par le JL**, incluant des gènes codant pour les structures permettant la perception de la photopériode (les photorécepteurs – phytochromes et cryptochromes (*PHY A* et *CRY 2*

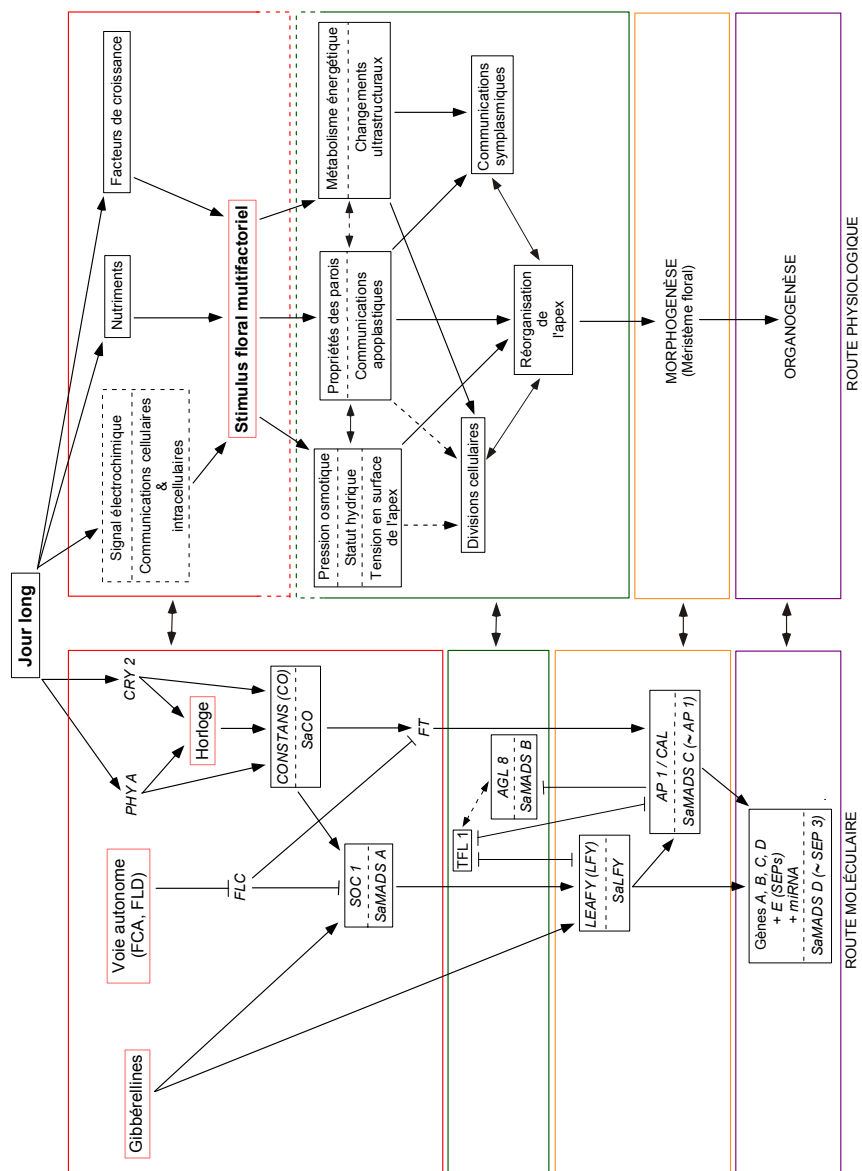
notamment) - et les composants de l'horloge biologique), ainsi que le gène *CONSTANS* (*CO*) en aval.

- La **voie de promotion autonome**, activée dans toutes les conditions de culture et incluant un certain nombre de gènes qui répriment tous l'activité du gène *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*), inhibiteur de la floraison.
- La **voie de promotion par les gibbérellines** (GA), incluant des gènes impliqués dans la biosynthèse des GA et la sensibilité à ces facteurs de croissance.

Ces trois voies sont intégrées au niveau de deux gènes, SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO 1 (SOC 1) et FLOWERING LOCUS T (FT).

Finalement, FT, SOC 1, et la voie des GA activent l'expression des gènes d'identité du méristème floral, LEAFY (LFY), APETALA 1 (AP 1) et CAULIFLOWER (CAL) qui eux-mêmes activent l'expression des gènes d'identité des organes.

Le contrôle génétique de la floraison chez *A. thaliana* a récemment été revu par Jack (2004).



**Figure 58:** schéma des interactions proposées entre les routes moléculaires (chez *A. thaliana*) et physiologiques impliquées dans la transduction du signal de floraison, basé sur les données connues chez *S. alba* et d'autres systèmes, dont *Ch. rubrum* (Albrechtová et al., 2003, 2004 et résultats non publiés). Les cadres de couleur indiquent les différentes phases de la transition florale, déterminées sur base des divers types de gènes contrôlant la floraison (rouge : période de floraison, vert : identité du méristème inflorescentiel, orange : identité du méristème floral, violet : identité des organes floraux). Les lignes et cadres en pointillés signalent un événement particulièrement hypothétique. Activation :  $\rightarrow$ , répression :  $\vdash$

## **Perspectives**

Notre travail ne constitue cependant qu'une timide avancée dans un domaine d'investigation entièrement nouveau et fait donc émerger de nouveaux problèmes.

- Tout d'abord, il est essentiel de pouvoir analyser l'expression des PME dans le SAM en transition florale.

### **- Au niveau transcriptionnel**

L'approche la plus quantitative et la plus globale serait une comparaison des teneurs en messagers de PME présents dans des broyats de méristèmes végétatifs et induits à fleurir, par la technique de la RT-PCR et avec les amorces que nous avons définies. L'analyse par hybridation in situ ou RT-PCR in situ pourrait donner des indications quant aux zones de l'apex concernées par l'expression des PME. Nos séquences SaPME pourraient être utilisées à cette fin. Cependant, il serait intéressant d'identifier les isoformes spécifiquement exprimées lors de la transition florale.

### **- Au niveau traductionnel**

Nous avons vu que la production d'un polysérum contre une zone conservée de PME est source d'importantes difficultés pour l'accessibilité des anticorps à l'enzyme. Difficultés que nous ne pouvions prévoir, la structure tridimensionnelle des PME n'étant pas disponible à l'époque. Une alternative serait de cloner les isoformes spécifiquement exprimées lors de la transition florale dans un vecteur d'expression et de produire un polysérum contre la partie protéique de ces enzymes, pour utilisation en immunocytochimie.

Au cas où une modification de l'expression des PME serait détectée dans le SAM de *Sinapis*, il faudrait se poser la question de l'origine de ces enzymes. Ces dernières pourraient être exprimées ou sécrétées spécifiquement au niveau de l'apex, ou transportées depuis d'autres organes, sous forme de protéine,

---

mais également de messenger. En effet, Xonocostle-Cazarès *et al.* (1999) ont montré que des ARN-m peuvent également circuler dans le phloème. De plus, une PME ubiquiste du tabac est capable de s'associer spécifiquement aux protéines de mouvement du virus de la mosaïque du tabac et de fixer des ARN (Dorokhov *et al.*, 1999). Une fois associée, elle peut circuler dans les sèves et permettre le passage de sa cargaison au travers des plasmodesmes. Toutefois, il semble évident que la fonction biologique de cette PME de tabac ne se limite pas à son rôle dans l'infection virale.

- D'autre part, nous avons vu que la dégradation des pectines de l'apex libère très probablement des fragments pectiques, qui pourraient agir en tant que signaux à courte ou longue distance.

La recherche de la présence de ces fragments dans les sèves phloémiennes et xylémiennes et la comparaison des teneurs présentes chez des plantes avant et après induction florale permettrait d'éclairer cette question.

- En outre, il semble de première importance de poursuivre les efforts entrepris pour la production de sondes immunologiques dirigées contre des épitopes pectiques bien particuliers, ou contre des enzymes de synthèse des polysaccharides pariétaux.

Les études immunocytochimiques des polysaccharides pectiques de ces dix dernières années ont largement contribué à la représentation actuelle selon laquelle la paroi cellulaire est une mosaïque de domaines avec différentes fonctions et compositions spécifiques (Guglielmino *et al.*, 1997b ; Bush & McCann, 1999).

L'utilisation des sondes existantes et la production de nouvelles sondes immunologiques permettrait une meilleure compréhension du rôle joué par chaque type de pectine dans l'adhésion cellulaire, dans les modifications liées à la différenciation des cellules méristématiques - que ce soit pour la production de structures végétatives ou reproductrices - ou encore pour le contrôle du trafic apoplastique et symplasmique.

- **Ainsi :**

■ **Dans le SAM en transition florale**

Produire des sondes contre les HG synthases et les acétyltransférases, afin d'étudier leur expression lors de la ré-augmentation du contenu en pectines à la 48<sup>ème</sup> heure après le début du JL.

■ **Dans le SAM végétatif**

Identifier et produire des sondes contre les structures polysaccharidiques impliquées dans l'adhésion cellulaire et le contrôle de la taille des pores de la matrice : les gels de type intermédiaire entre les gels calciques et les gels acides souples, les borate-diols esters et les uronyl- et feruloyl- esters (ou autres esters faisant intervenir des phénols) - permettant tous deux un renforcement de la paroi par l'interaction avec d'autres polysaccharides pectiques et avec les hémicelluloses, respectivement.

L'utilisation combinée de ces sondes sur des SAM végétatifs et induits, et leur localisation en fonction des différentes zones de l'apex, pourrait apporter de nombreuses informations essentielles quant à leurs rôles respectifs.

- Enfin, il serait intéressant de vérifier que les résultats obtenus chez *Sinapis* se retrouvent chez *Arabidopsis thaliana*.

L'existence, chez *Arabidopsis* mais pas chez *Sinapis*, d'un système de transformation génétique performant est un atout qui permettrait des avancées importantes. Un système d'induction florale par un JL chez *Arabidopsis*, identique au système *Sinapis*, a été mis au point dans le laboratoire de Physiologie Végétale de l'Université de Liège (Corbesier *et al.*, 1996). Par ailleurs, plusieurs études ont montré la très grande similitude entre ces deux espèces, tant du point de vue morphologique (mêmes inflorescences et mêmes fleurs) que de celui des contrôles physiologique et génétique, lors de leur passage de l'état végétatif à l'état reproducteur (Bernier *et al.*, 1993 ; Corbesier *et al.*, 1996, 1998, 2002 ; Kania *et al.*, 1997 ; Bonhomme *et al.*, 2000 ; Borner *et al.*, 2000).



- 
- Pour autant que nos résultats puissent être extrapolés à *Arabidopsis*, il serait intéressant d'analyser les conséquences de mutations affectant les pectines sur l'architecture des parois de SAM végétatifs, sur le moment de floraison et la morphologie florale.

Malgré les difficultés rencontrées pour la production de mutants spécifiquement touchés au niveau des pectines (pléiotropie, redondance des gènes, hétérogénéité dans un tissu, une cellule), certains mutants intéressants dans le cadre de notre travail sont déjà disponibles.

- **Ainsi :**

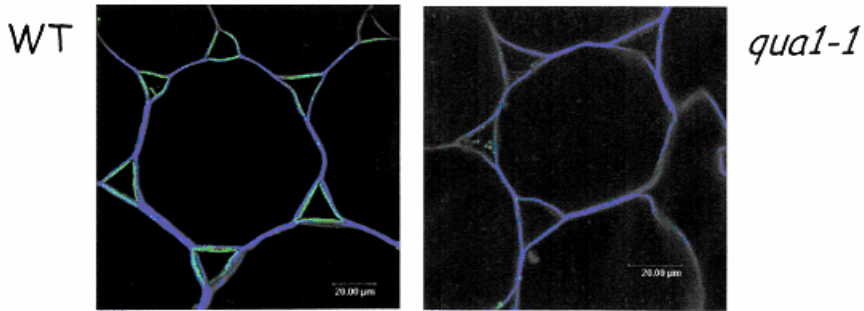
■ ***QUASIMODOI* (Bouton *et al.*, 2002)**

Ce gène code pour une glycosyltransférase pouvant jouer un rôle central dans la synthèse des polysaccharides pectiques. Les mutants sont nains, présentent une réduction du contenu en acide galacturonique des parois et une adhésion cellulaire réduite. De Plus, l'immunolocalisation avec JIM7 et JIM5 (Bouton *et al.*, 2002) ainsi qu'avec le 2F4 (INRA - H. Höfte, résultats non publiés – figure 59) a montré que ces mutants contiennent moins d'HG dans les parois des racines et des tiges, respectivement.

■ ***mur1* (Reiter *et al.*, 1997)**

Ce mutant est déficient en GDP-L-Fuc et sa petite taille est due à l'absence de résidus fucose dans le RGII, empêchant ce dernier de former des dimères de bore (Bouton *et al.*, 2002).

Les techniques de la génomique (ARN interférant, transposition, ADN-T, ...) permettant la production de nouveaux mutants spécifiquement touchés au niveau des pectines semblent donc du plus grand intérêt pour l'avenir. De même, l'identification des enzymes de synthèse des pectines, et surtout des gènes correspondants, permettrait de grandes avancées.



**Figure 59 :** localisation immunocytochimique des homogalacturonanes sous leur conformation en « boîtes à œufs » induite par le  $\text{Ca}^{2+}$  (anticorps 2F4), sur coupes de tiges d'*A. thaliana* (WT et mutant *QUA1-1*). Repris de H. Höfte (“Genetic to study cell wall synthesis and assembly” – INRA – Fichier PDF, site web : <http://www.inra.fr/gdr-biopolymeres/pointpdf/paroihhofte.pdf>).

# Annexes



# 1. Modèles de l'organisation du réseau de cellulose-XG

---

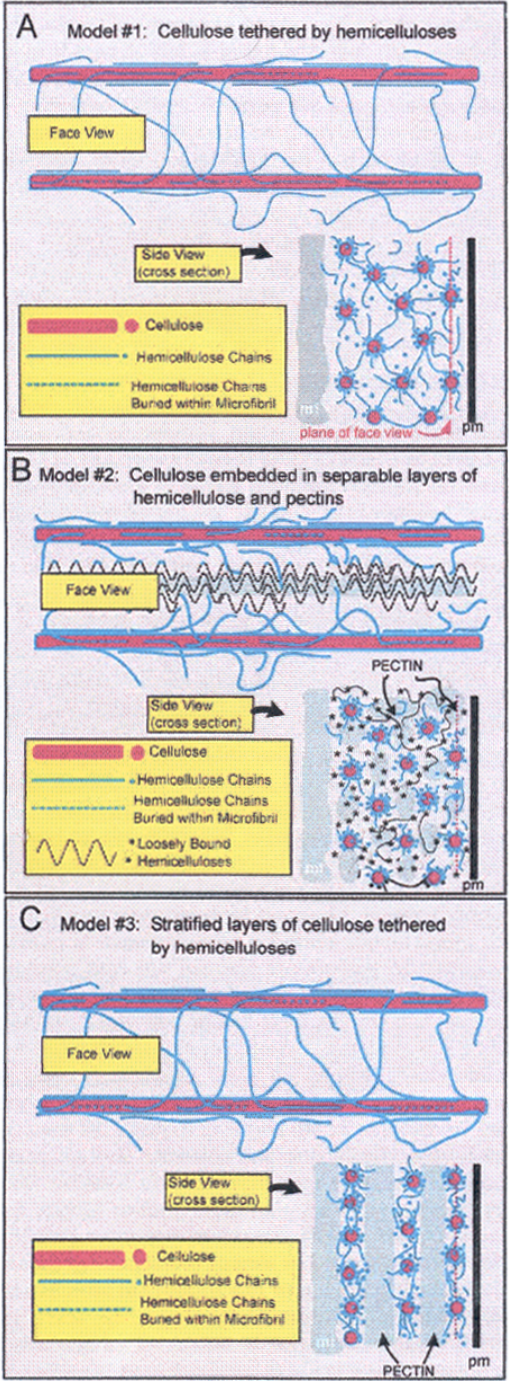
Il existe trois modèles hypothétiques tentant de présenter l'organisation des microfibrilles de cellulose et des chaînes de XG dans les parois primaires (Cosgrove, 2000a). La figure 60 montre la représentation schématique de chacun de ces modèles.

## ■ « Sticky network model »

Dans ce premier modèle (figure 60 A), les microfibrilles de cellulose sont représentées comme des bâtonnets liés les uns aux autres par de longues chaînes de XG se liant à la surface des microfibrilles ou étant insérées physiquement à l'intérieur de ces dernières lors de leur formation. Selon ce modèle, les XG sont responsables de la résistance mécanique et de l'intégrité physique des microfibrilles de cellulose et empêchent leur association en faisceaux. D'après ce modèle simplifié de la paroi, le xyloglucane est le polysaccharide clé contrôlant l'expansion pariétale. Toutefois, il n'existe que de maigres preuves indiquant que les microfibrilles sont directement couplées les unes aux autres par des chaînes individuelles de XG. De plus, les études de viscoélasticité de la paroi semblent nécessiter la construction d'un modèle plus complexe.

## ■ « Multi coat model »

Ce second modèle, légèrement différent, est proposé par Talbott & Ray (1992) (repris de Cosgrove, 2000a) et semble plus proche de la réalité (figure 60 B). Il envisage les microfibrilles de cellulose comme étant recouvertes d'une couche de XG et ensuite englobées dans des couches successives de polymères hémicellulosiques liés de façon plus lâche, et finalement de pectines, qui remplissent les interstices entre les fibrilles de cellulose/hémicellulose. Dans ce modèle il n'y a pas de liens directs entre microfibrilles voisines. Les microfibrilles sont plutôt attachées les unes aux autres par les forces cohésives entre les couches successives de polymères matriciels associés latéralement.



**Figure 60:** modèles alternatifs de la paroi cellulaire végétale. Pour chaque modèle, des sections à travers deux plans différents de la paroi sont présentées (pm : membrane plasmique, ml : lamelle mitoyenne). Repris de Cosgrove, 2000a.

Selon ce modèle, les XG ne constituent pas nécessairement la clé de l'expansion pariétale. Les pectines et les hémicelluloses intermédiaires sont aussi candidats, et même peut-être de façon plus probable en raison de leur localisation spatiale. Ces polymères présentent une plus grande mobilité et sont ainsi de possibles déterminants de l'expansion de la paroi. Ils pourraient agir comme lubrifiant permettant de faciliter le glissement des microfibrilles.

## ■ « Stratified wall model »

Cet hybride entre les deux premiers modèles est proposé par Ha *et al.* (1997) (figure 60 C). Selon ces auteurs, les microfibrilles de cellulose sont directement reliées par le XG, comme dans le premier modèle, sauf que cette liaison ne s'effectue que dans une seule couche de fibrilles. Les pectines sont alors situées dans une zone distincte entre les couches individuelles de microfibrilles et contrôlent l'espacement et les interactions entre ces couches, ainsi que l'épaisseur totale de la paroi, mais ont moins d'influence sur les forces de tension de la paroi.





## 2. Méthode de mesure des intensités de marquage en microscopie confocale

### ■ Coupes désestérifiées à la PME : comparaison ZM et ZNM

Pour chacune des zones sélectionnées sur une image, le programme de quantification du microscope confocal nous donne un tableau du style de celui présenté figure 61. Les pixels verts, correspondant au marquage y sont triés en différentes classes allant de 0 à 254 en fonction de leur intensité (la classe 0 ne correspondant pas à une intensité nulle mais minimale). Le tableau nous donne également le nombre de pixels verts appartenant à chacune de ces classes pour la zone sélectionnée.

| Zone méristématique |                |           | Zone non méristématique |                |           |
|---------------------|----------------|-----------|-------------------------|----------------|-----------|
| Intensités          | Pixels (verts) | bPv       | Intensités              | Pixels (verts) | bPv       |
| 0                   | 22417          | 0         | 0                       | 73220          | 0         |
| 1                   | 4177           | 4177      | 1                       | 13134          | 13134     |
| 2                   | 3276           | 6552      | 2                       | 10319          | 20638     |
| 3                   | 2680           | 8040      | 3                       | 8607           | 25821     |
| 4                   | 2294           | 9176      | 4                       | 7017           | 28068     |
| 5                   | 1993           | 9965      | 5                       | 5918           | 29590     |
| 6                   | 1689           | 10134     | 6                       | 4961           | 29766     |
| 7                   | 1363           | 9541      | 7                       | 4089           | 28623     |
| 8                   | 1148           | 9184      | 8                       | 3213           | 25704     |
| 9                   | 909            | 8181      | 9                       | 2570           | 23130     |
| 10                  | 768            | 7680      | 10                      | 2074           | 20740     |
| 11                  | 623            | 6853      | 11                      | 1744           | 19184     |
| 12                  | 484            | 5808      | 12                      | 1406           | 16872     |
| 13                  | 421            | 5473      | 13                      | 1051           | 13663     |
| 14                  | 329            | 4606      | 14                      | 837            | 11718     |
| 15                  | 247            | 3705      | 15                      | 717            | 10755     |
| 16                  | 255            | 4080      | 16                      | 565            | 9040      |
| ...                 | ...            | ...       | ...                     | ...            | ...       |
| 254                 | 0              | 0         | 254                     | 0              | 0         |
| Somme (1)           |                | Somme (2) | Somme (1)               |                | Somme (2) |

**Figure 61** : tableau (remanié dans Excel) donné par le programme de quantification du microscope confocal lors de la sélection d'une zone particulière et reprenant le nombre de pixels verts présents dans cette zone et leur intensité correspondante.

## Détermination du seuil de bruit de fond

---

La ligne rouge sur le tableau représente le seuil de bruit de fond (BF), les pixels verts présents au-dessus de cette ligne ne sont pas pris en compte dans les calculs. Ce seuil est déterminé par la prise de 8 profils de parois sur la même image, dont on fera la moyenne.

La figure 62 a montre comment sont sélectionnés ces profils, en dessinant 8 « barres » passant par les parois (le bruit de fond étant considéré comme homogène sur l'ensemble de la coupe, la zone où sont effectuées ces mesures n'a pas d'importance).

Pour chacune des « barres » dessinées, le programme de quantification nous donne un profil (figure 62 b) sur lequel on remarque bien le pic où l'intensité du marquage vert est maximale (zone de paroi) ainsi que les pics secondaires (zone de bruit de fond). On trace ensuite une ligne au-dessus de ces pics secondaires, ce qui nous donne une valeur d'intensité estimée du bruit de fond. On en fait la moyenne pour les 8 profils obtenus et c'est cette valeur qui est ensuite reportée dans le tableau Excel.

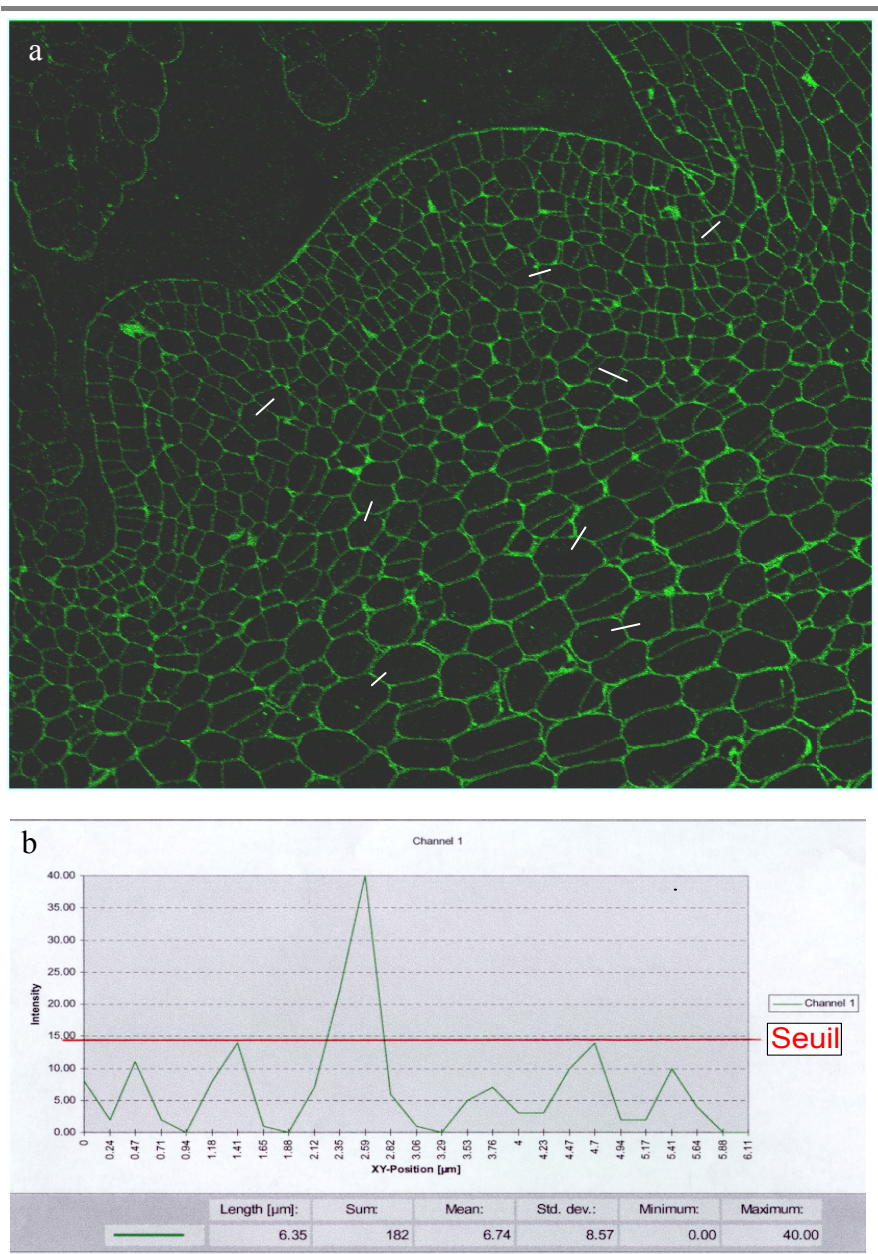
## Détermination du coefficient de surface de paroi estimé

---

La surface occupée par les parois pour chacune des zones sélectionnées, par rapport à la surface totale, est estimée une fois pour toutes sur quelques coupes désestérifiées à la PME. En effet, comme toutes les parois sont marquées sur les coupes PME, la somme des pixels verts donne une estimation de la surface totale des parois. Cette estimation est réalisée sur 4 images pour chaque objet analysé et pour chacune des zones. La formule est la suivante :

$$S_{\text{parois estimée}} = \frac{\text{Somme (Pixels verts } (> \text{ seuil BF) ) } * \text{Surface d'un pixel vert } (\mu\text{m}^2)}{\text{Surface sélectionnée } (\mu\text{m}^2)}$$

Avec Somme (Pixels verts > seuil BF) = Somme 1 dans le tableau de la Fig. 61.



**Figure 62 :** détermination du seuil de bruit de fond. (a) Sélection de 8 « barres » (blanches) passant par les parois. (b) Graphe donné (pour chaque « barre » sélectionnée) par le programme de quantification du microscope confocal, représentant un profil de parois.

Le coefficient de surface de paroi estimé (Coef.  $S_{\text{parois estimé}}$ ) est déterminé par la moyenne des 4 mesures, pour chaque objet analysé (végétatif (V) et induit (I), pour chaque temps de prélèvement) et chaque type de zone (ZM, ZNM mais aussi L1,L2, L3+M, ZPs, ZC). Il représente un pourcentage (fixé pour chaque type de zone) de la surface totale de la zone sélectionnée, occupé par les parois. La surface totale de la zone sélectionnée ( $\mu\text{m}^2$ ) est donnée par le programme de quantification du microscope.

## Calcul du rapport ZM/ZNM

Le rapport des intensités de marquage de la ZM et de la ZNM est calculé de la façon suivante :

$$\begin{aligned} \text{Intensité marquage ZM/ZNM} &= \frac{\left[ \frac{\text{Somme (Intensité * Pixels verts (> seuil BF) )}}{\text{Surface sélectionnée } (\mu\text{m}^2) * \text{Coef. } S_{\text{parois estimé (ZM)}}} \right]_{\text{ZM}}}{\left[ \frac{\text{Somme (Intensité * Pixels verts (> seuil BF) )}}{\text{Surface sélectionnée } (\mu\text{m}^2) * \text{Coef. } S_{\text{parois estimé (ZNM)}}} \right]_{\text{ZNM}}} \\ &= \frac{\left[ \frac{\text{Somme 2}}{S (\mu\text{m}^2) * \text{Coef. } S_{\text{parois estimé (ZM)}}} \right]_{\text{ZM}}}{\left[ \frac{\text{Somme 2}}{S (\mu\text{m}^2) * \text{Coef. } S_{\text{parois estimé (ZNM)}}} \right]_{\text{ZNM}}} \end{aligned}$$

En multipliant le nombre de pixels verts (> seuil BF) par leur intensité correspondante, dans le tableau de la figure 61, et en sommant le tout, on obtient une valeur (somme 2) qui, divisée par le produit de la surface totale de la zone sélectionnée (S), et du Coef.  $S_{\text{parois estimé}}$  de cette même zone, nous donne une valeur représentant l'intensité de marquage par  $\mu\text{m}^2$  de paroi dans la zone sélectionnée. En faisant le rapport de cette valeur calculée pour la ZM et la ZNM d'une même image, on obtient une nouvelle valeur qui pourra être comparée d'une coupe à une autre et dont l'évolution pourra être suivie au cours des différents temps de prélèvement pour les apex végétatifs et induits à fleurir.

## ■ Coupes non désestérifiées : comparaisons ZM/ZNM et à l'intérieur de la ZM

Le principe est identique pour le calcul du rapport des intensités de marquage des zones ZM et ZNM, L1,L2 et L3+M, ainsi que ZP et ZC, sur coupes non désestérifiées. Cependant, le bruit de fond étant nettement plus rare sur ces coupes et plus difficile à mesurer, nous n'avons pas établi de seuil de bruit de fond, tous les pixels verts effectivement mesurés étant considérés comme du marquage. Ce bruit de fond étant en outre considéré comme homogène sur la coupe, cela ne doit pas poser de problèmes.

$$\text{Intensité marquage ZPs/ZC} = \frac{\left[ \frac{\text{Somme (Intensité * Pixels verts)}}{\text{Surface sélectionnée } (\mu\text{m}^2) * \text{Coef. S}_{\text{parois estimé (ZPs)}}} \right]_{\text{ZPs}}}{\left[ \frac{\text{Somme (Intensité * Pixels verts)}}{\text{Surface sélectionnée } (\mu\text{m}^2) * \text{Coef. S}_{\text{parois estimé (ZC)}}} \right]_{\text{ZC}}}$$

$$\text{Intensité marquage L1+L2/L3+M} = \frac{\left[ \frac{\text{Somme (Intensité * Pixels verts)}}{\text{Surface sélectionnée } (\mu\text{m}^2) * \text{Coef. S}_{\text{parois estimé (L1+L2)}}} \right]_{\text{L1+L2}}}{\left[ \frac{\text{Somme (Intensité * Pixels verts)}}{\text{Surface sélectionnée } (\mu\text{m}^2) * \text{Coef. S}_{\text{parois estimé (L3+M)}}} \right]_{\text{L3+M}}}$$

$$\text{Intensité marquage ZM/ZNM} = \frac{\left[ \frac{\text{Somme (Intensité * Pixels verts)}}{\text{Surface sélectionnée } (\mu\text{m}^2) * \text{Coef. S}_{\text{parois estimé (ZM)}}} \right]_{\text{ZM}}}{\left[ \frac{\text{Somme (Intensité * Pixels verts)}}{\text{Surface sélectionnée } (\mu\text{m}^2) * \text{Coef. S}_{\text{parois estimé (ZNM)}}} \right]_{\text{ZNM}}}$$



### 3. Liste des posters présentés

---

- **Réunion de la SPVF – Namur - 8 mai 1998**

S. Sobry, A. Havelange, G. Bernier and P. Van Cutsem (1998)  
Immunocytochemical localisation of methyl- and acetyl- esterified pectins in the apex of the long day plant *Sinapis alba* at flowering transition.

*Arch. Physiol. Biochem.*, 106 (1) 74.

- **8<sup>th</sup> international Cell Wall Meeting**

John Innes Centre – Norwich - 1 au 5 septembre 1998

S. Sobry, A. Havelange, G. Bernier and P. Van Cutsem (1998)  
Immunocytochemical localisation of methyl- and acetyl- esterified pectins in the apex of the long day plant *Sinapis alba* at flowering transition.

*Publié dans les actes du colloque.*

- **Réunion de la SPVF – Gembloux – 15 octobre 1999**

S. Sobry, A. Havelange, G. Bernier and P. Van Cutsem (1999)  
Modifications of the *Sinapis alba* (L.) meristem during floral transition: production of polyclonal antibodies against highly conserved sequences of pectin methylesterases.

*Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège, Vol. 68, 5-6.*

- **PPC meeting (Plant Protein Club) - York - 21 au 23 mars 2001**

Added value products from plants (2. Cell wall components)

S. Sobry, A. Havelange, G. Bernier and P. Van Cutsem (2001)  
Modifications of the *Sinapis alba* meristem during floral transition: immunocytochemical localisation of pectins and production of polyclonal antibodies against highly conserved sequences of pectin methylesterases.

*Publié dans les actes du colloque*





# Bibliographie



- Abdel-Massih RM, Baydoun EAH, Brett CT** (2003) In vitro biosynthesis of 1,4- $\beta$ -galactan attached to a pectin-xyloglucan complex in pea. *Planta* 216(3): 502-511
- Albani D, Altosaar I, Arnison P, Fabijanski S** (1991) A gene sequence similarity to pectin esterase is specifically expressed in developing pollen of *Brassica napus*. Sequences in its 5' flanking region are conserved in other pollen-specific promoters. *Plant Molecular Biology* 16: 501-513
- Albersheim P, Darvill AG** (1985) Oligosaccharins. *Scientific American* 253: 58-64
- Albrechtová JTP, Dueggelin M, Duerrenberger M, Wagner E** (2004) Changes in the geometry of the apical meristem and concomitant changes in cell wall properties during photoperiodic induction of flowering in *Chenopodium rubrum*. *New Phytol* 163: 263-269
- Albrechtová JTP, Heilscher S, Leske L, Walczysko P, Wagner E** (2003) Calcium and pH patterning at the apical meristem are specifically altered by photoperiodic flower induction in *Chenopodium* spp. *Plant Cell and Environment*: 1985-1994
- Alexandre F, Morvan O, Gaffé J, Marek A, Jauneau A, Dauchel H, Balangé A, Morvan C** (1997) Pectin methylesterase pattern in flax seedlings during their development. *Plant Physiol Biochem* 35(6): 427-436
- Al-Qsous S, Carpentier E, Klein-Eude D, Burel C, Mareck A, Dauchel H, Gomord V, Balangé PA** (2004) Identification and isolation of a pectin methylesterase isoform that could be involved in flax cell wall stiffening. *Planta* 219(2): 369-78
- Baron-Epel O, Hernandez D, Jiang L-W, Meiners S, Schindler M** (1988) Dynamic continuity of cytoplasmic and membrane compartments between plant cells. *J Cell Biol* 106: 715-721
- Benet C, Van Cutsem P** (2002) Negative purification method for the selection of specific antibodies from polyclonal antisera. *BioTechniques* 33: 1050-1054
- Berger F, Taylor A, Brownlee C** (1994) Cell fate determination by the cell wall in early fucus development. *Science* 263: 1421-1423
- Bernier G** (1969) *Sinapis alba* L. In: Evans LT (Ed) *The Induction of Flowering. Some Case Histories*. MacMillan, Melbourne, pp 305-327
- Bernier G** (1988) The control of floral evocation and morphogenesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 39: 175-219
- Bernier G** (1989) Events of the Floral Transition of Meristems. In: Lord E, Bernier G (eds) *Plant Reproduction: from Floral Induction to Pollination*. American Society of Plant Physiologists Series, vol. I, Rockville, Maryland, 42-50
- Bernier G** (1997) Growth changes in the shoot apex of *Sinapis alba* during transition to flowering. *J Exp Bot* 48: 1071-1077
- Bernier G, Corbesier L, Périlleux C** (2002) The flowering process: on the track of controlling factors in *Sinapis alba*. *Russ J Plant Physiol* 49(4): 445-450

- Bernier G, Corbesier L, Périlleux C, Havelange A, Lejeune P** (1998) Physiological Analysis of the Floral Transition. In : Cockshull KE, Gray D, Seymour GB, Thomas B (eds) Genetic and Environmental Manipulation of Horticultural Crops. CAB International, Wallingford, pp 103-109
- Bernier G, Havelange A, Houssa C, Petitjean A, Lejeune P** (1993) Physiological signals that induce flowering. *Plant Cell* 5: 1147-1155
- Bernier G, Kinet J-M, Bronchard R** (1967) Cellular events at the meristem during floral induction in *Sinapis alba* L. *Physiol Vég* 5: 311-324
- Bernier G, Kinet J-M, Jacqmard A, Havelange A, Bodson M** (1977) Cytokinin as a possible component of the floral stimulus in *Sinapis alba*. *Plant Physiol* 60: 282-285
- Bernier G, Kinet J-M, Sachs RM** (1981a) The Physiology of Flowering, vol I. CRC Press, Boca Raton, pp 83-103
- Bernier G, Kinet J-M, Sachs RM** (1981b) The Physiology of Flowering, vol II. CRC Press, Boca Raton, pp 35-53
- Bodson M, Outlaw WHJ** (1985) Elevation in the sucrose content of the shoot apical meristem of *Sinapis alba* at floral evocation. *Plant Physiol* 79: 420-424
- Bodson M, Remacle B** (1987) Distribution of assimilates from various source-leaves during the floral transition of *Sinapis alba* L. In: The manipulation of flowering: 341-350, Atherton, JG, ed. Butterworths, London
- Bonhomme F, Kurz B, Melzer S, Bernier G, Jacqmard A** (2000) Cytokinin and gibberellin activate *SaMADS A*, a gene apparently involved in regulation of the floral transition in *Sinapis alba*. *Plant J* 24: 103-111
- Bonhomme F, Sommer H, Bernier G, Jacqmard A** (1997) Characterization of *SaMADS D* from *Sinapis alba* suggests a dual function of the gene: in inflorescence development and floral organogenesis. *Plant Mol Biol* 34: 573-582
- Bordenave M** (1996) Analysis of pectin methyl esterases. In Modern Methods of Plant Analysis Vol. 17. Eds. Linskens H-F and Jackson JF – Springer Verlag Berlin Heidelberg
- Borner R, Kampmann G, Chandler J, Gleißner R, Wisman E, Apel K, Melzer S** (2000) A MADS domain gene involved in the transition to flowering in *Arabidopsis*. *The Plant J* 24(5): 591-599
- Bouton S, Leboeuf E, Mouille G, Leydecker M-T, Talbotec J, Granier F, Lahaye M, Höfte H, Truong H-N** (2002) *QUASIMODO1* encodes a putative membrane-bound glycosyltransferase required for normal pectin synthesis and cell adhesion in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 14: 2577-2590
- Bradley D, Carpenter R, Copsey L, Vincent C, Rothstein S, Coen ES** (1996) Control of inflorescence architecture in *Antirrhinum*. *Nature* 379: 791-797
- Brandtzaeg P** (1982) In Techniques in immunocytochemistry, 1, Bullock GR & Petrusz P (eds), Academic Press, London, 2-75
- Brown JA, Fry SC** (1993) Novel O-D-galacturonoyl esters in the pectic polysaccharides of suspension-cultured plant cells. *Plant Physiol* 103(3): 993-999

- 
- Bryan WH, Newcomb EH** (1954) Stimulation of pectin methylesterase activity of cultured tobacco pith by indoleacetic acid. *Physiol Plant* 7: 290-297
- Bush MS, Marry M, Huxham IM, Jarvis MC, McCann MC** (2001) Developmental regulation of pectic epitopes during potato tuberisation. *Planta* 213: 869-880
- Bush MS, McCann MC** (1999) Pectic epitopes are differentially distributed in the cell walls of potato (*Solanum tuberosum*) tubers. *Physiol Plant* 107: 201-213
- Carpita NC, Gibeaut DM** (1993) Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant J* 3(1): 1-30
- Carpita NC, Sabulase D, Montezinos D, Delmer DP** (1979) Determination of the pore size of cells walls of living plants. *Science* 205: 1144-1147
- Casero PJ, Knox JP** (1995) The monoclonal antibody JIM 5 indicates patterns of pectin deposition in relation to pit fields at the plasma-membrane-face of tomato pericarp call walls. *Protoplasma* 188: 133-137
- Catoire L, Pierron M, Morvan C, du Penhoat H, Goldberg R** (1998) Investigation of the action patterns of pectin methylesterase isoforms through kinetic analyses and NMR spectroscopy. Implications in cell wall expansion. *J Biol Chem* 273: 33150-33156
- Chailakhyan MK** (1936) On the hormonal theory of plant development. *Dokl Akad Sci SSSR* 12: 443-447
- Chen M-H, Sheng J, Hind G, Hana AK, Citovsky V** (2000) Interaction between the tobacco mosaic virus movement protein and host cell pectin methylesterases is required for viral cell-to-cell movement. *The EMBO J* 19(5): 913-920
- Christensen TMIE, Nielsen JE, Kreiberg JD, Rasmussen P, Mikkelsen JD** (1998) Pectin methylesterase from orange-fruit: characterization and localization by *in-situ* hybridization and immunocytochemistry. *Planta* 206: 493-503
- Cilia ML, Jackson D** (2004) Plasmodesmata form and function. *Curr Op Cell Biol*, 16: 500-506
- Clausen MH, Willats WGT, Knox JP** (2003) Synthetic methyl hexagalacturonate hapten inhibitors of anti-homogalacturonan monoclonal antibodies LM7, JIM5 and JIM7. *carbohydr Res* 338: 1797-1800
- Corbesier L, Bernier G, Perilleux C** (2002) C:N ratio increases in the phloem sap during floral transition of the long-day plants *Sinapis alba* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 43(6): 684-8
- Corbesier L, Gadisseur I, Silvestre G, Jacquard A, Bernier G** (1996) Design in *Arabidopsis thaliana* of a synchronous system of floral induction by one long day. *Plant J* 9: 947-952
- Corbesier L, Lejeune P, Bernier G** (1998) The role of carbohydrates in the induction of flowering in *Arabidopsis thaliana*: comparison between the wild type and a starchless mutant. *Planta* 206: 131-137
- Cosgrove DJ** (1999) Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 391-417

- Cosgrove DJ** (2000a) Expansive growth of plant cell walls. *Plant Physiol biochem* 38(1/2): 109-124
- Cosgrove DJ** (2000b) Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature* 407: 321-326
- Cosgrove DJ** (2001) Plant cell walls: wall-associated kinases and cell expansion. *Current Biol* 11: R558-R559
- Cremer F, Van de Walle C, Bernier G** (1992) Changes in the pattern of proteins synthesized in the shoot apical meristem of *Sinapis alba* during floral transition. *Plant Cell Physiol* 33: 1199-1207
- Dauchot N** (1999) Etude de la transcription du gène de la pectine méthylestérase dans l'apex de *Sinapis alba* (L.) lors de la transition florale. Mémoire de licence, Université de Namur (FUNDP), Belgique
- Decreux A, Messiaen J** (2005) Wall-associated kinase WAK1 interacts with cell wall pectins in a calcium-induced conformation. *Plant Cell Physiol*, in press
- Ding B, Lucas WJ** (1996) Secondary plasmodesmata: Biogenesis, Special Functions, and Evolution. In: Smallwood M, Knox P, Bowles D (eds) *Membranes: Specialized Functions in Plants*. BIOS Scientific Publishers Inc., Oxford, pp 489-506
- Dolan L, Linstead P, Roberts K** (1997) Developmental regulation of pectic polysaccharides in the root meristem of *Arabidopsis*. *J of Exp. Botany* 48(308): 713-720
- Dorokhov YL, Mäkinen K, Frolova OY, Merits A, Saarinen J, Kalkkinen N, Atabekov JG, Saarma M** (1999) A novel function for a ubiquitous plant enzyme pectin methylesterase: the host-cell receptor for the tobacco mosaic virus movement protein. *FEBS Letters* 461: 223-228
- Downie B, Dirk LMA, Hadfield KA, Wilkins TA, Bennett AB, Bradford KJ** (1998) A gel diffusion assay for quantification of pectin methylesterase activity. *Analytical Biochem* 264: 149-157
- Earnshaw WC, Rothfield N** (1985) Identification of a family of human centromere proteins using autoimmune sera from patients with scleroderma. *Chromosoma (Berl)* 91: 313-321
- Ebbelaar M, Tucker G, Laats M, van Dijck C, Stolle-Smits T, Recourt K** (1996) Characterization of pectinases and pectin methylesterase cDNAs in pods of green beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Mol. Biol* 31: 1141-1151
- Eberhard S, Doubrava N, Marfà V, Mohnen D, Southwick A, Darvill A, Albersheim P** (1989) Pectic cell wall fragments regulate tobacco thin-cell-layer explant morphogenesis. *The Plant Cell* 1: 747-755
- Fagard M, Höfte H, Vernhettes S** (2000) Cell wall mutants. *Plant Physiol and Bioch* 38(1): 15-25
- Femenia A, Garosi P, Roberts K, Waldron KW, Selvendran RR, Robertson JA** (1998) Tissue-related changes in methyl-esterification of pectic polysaccharides in cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. Botrytis) stems. *Planta* 205: 438-444

- 
- Femenia A, Waldron KW, Robertson JA, Selvendran RR** (1999) Compositional and structural modification of the cell wall of cauliflower (*Brassica oleracea* L. var botrytis) during tissue development and plant maturation. *Carbohydrate Polymers* 39: 101-108
- Foster TJ, Ablett S, McCann MC, Gidley MJ** (1996) Mobility resolved C-13 NMR spectroscopy of primary plant cell walls. *Biopolymers* 39: 51-66
- Frenkel C, Peters JS, Tieman DM, Tiznado ME, Handa AK** (1998) Pectin methylesterase regulates methanol and ethanol accumulation in ripening tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruit. *The J of Biol Chem* 273(8): 4293-4295
- Friedman H, Goldschmidt EE, Spiegelstein H, Halevy AH** (1992) A rhythm in the flowering response of photoperiodically-induced *Pharbitis nil* to agents affecting cytosolic calcium and pH. *Physiol Plant* 85: 57-60
- Gaffé J, Tieman D, Handa A** (1994) Pectin methylesterase isoforms in tomato (*Lycopersicon esculentum*) tissues. *Plant Physiol* 105: 199-203
- Gaffé J, Tiznado ME, Handa AK** (1997) Characterization and functional expression of a ubiquitously expressed tomato pectin methylesterase. *Plant Physiol* 114: 1547-1556
- Gillet C, Voué M, Cambier P** (1998) Site-specific counter ion binding and pectic chains conformational transitions in the *Nitella* cell wall. *J Exp Bot* 49: 797-805
- Giovane A, Balestrieri C, Quagliuolo L, Castaldo D, Servillo L** (1995) A glycoprotein inhibitor of pectin methylesterase in kiwi fruit - purification by affinity chromatography and evidence of a ripening-related precursor. *Eur J Biochem* 233: 926-929
- Giovane A, Servillo L, Balestrieri C, Raiola A, D'Avino R, Tamburrini M, Ciardiello MA, Camardella L** (2004) Pectin methylesterase inhibitor. *Biochim Biophys Acta* 1696(2): 245-52
- Goldberg R, Morvan C, Jauneau A, Jarvis MC** (1995) Methyl-esterification, de-esterification and gelation of pectins in the primary cell wall. In *Progress in biotechnology 14, Pectins and Pectinases*, Visser J and Voragen AGJ, ed, Proc Int Symp, Wageningen, The Netherlands, Elsevier Sci BV, 151-172
- Goldberg R, Morvan C, Jauneau A, Jarvis MC** (1996) Methyl-esterification, de-esterification and gelation of pectins in the primary cell wall. In: Visser J, Voragen AGJ (eds) *Pectins and pectinases*. Elsevier, Amsterdam, 151-172
- Goldberg R, Pierron M, Bordenave M, Breton C, Morvan C, Hervé du Penhoat C** (2001) Control of mung bean pectinmethylesterase isoform activities. Influence of pH and carboxyl group distribution along the pectic chains. *The J of Biol Chem* 276(12): 8841-8847
- Goldberg R, Pierron M, Durand I, Mutaftschiev S** (1992) *In vitro* and *in situ* properties of cell wall pectinmethylesterases from mung bean hypocotyls. *J Exp Bot* 43: 41-46
- Gonthier R, Jacqmard A, Bernier G** (1985) Occurrence of two cell subpopulations with different cell-cycle durations in the central and

- peripheral zones of the vegetative shoot apex of *Sinapis alba* L. *Planta* 165: 288-291
- Gonthier R, Jacquemard A, Bernier G** (1987) Changes in cell-cycle duration and growth fraction in the shoot meristem of *Sinapis* during floral transition. *Planta* 170: 55-59
- Gorshkova TA, Chemiksova SB, Lozovaya VV, Carpita NC** (1997) Turnover of galactans and other cell wall polysaccharides during development of flax plants. *Plant Physiol* 114 : 723-729
- Grant GT, Morris ER, Rees DA, Smith PJC, Thom D** (1973) Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model. *FEBS Letters* 32(1): 195-198
- Green PB** (1980) Organogenesis: a biophysical view. *Annual Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 31: 51-82
- Green PB** (1988) A theory for inflorescence development and flower formation based on morphological and biophysical analysis in *Echeveria*. *Planta* 175: 153-169
- Guglielmino N, Liberman M, Catesson AM, Mareck A, Prat R, Mutaftschiev S, Goldberg R** (1997a) Pectin methylesterases from poplar cambium and inner bark: localization, properties and seasonal changes. *Planta* 202: 70-75
- Guglielmino N, Liberman M, Jauneau A, Vian B, Catesson AM, Goldberg R** (1997b) Pectin immunolocalization and calcium visualization in differentiating derivatives from poplar cambium. *Protoplasma* 199: 151-160
- Ha MA, Apperley DC, Jarvis MC** (1997) Molecular rigidity in dry and hydrated onion cell walls. *Plant Physiol* 115: 593-598
- Harriman RW** (1990) Molecular cloning and expression of pectin methylesterase genes in *lycopersicum esculentum* (tomato). PhD thesis, Purdue University, West Lafayette, IN
- Hasunuma T, Fukusaki E, Kobayashi A** (2003) Methanol production is enhanced by expression of an *Aspergillus niger* pectin methylesterase in tobacco cells. *J Biotechnol* 106(1): 45-52
- Havelange A** (1989) Levels and ultrastructural localization of calcium in *Sinapis alba* during the floral transition. *Plant Cell Physiol* 30: 351-358
- Havelange A, Bernier G** (1974) Descriptive and quantitative study of ultrastructural changes in the apical meristem of mustard in transition to flowering. I. The cell and nucleus. *J Cell Sci* 15: 633-644
- Havelange A, Bernier G** (1983) Partial floral evocation by high irradiance in the long-day plant *Sinapis alba*. *Physiol Plant* 59: 545-550
- Havelange A, Bernier G** (1991) Elimination of flowering and most cytological changes after selective long-day exposure of the shoot tip of *Sinapis alba*. *Physio Plant* 81: 399-402
- Havelange A, Bernier G** (1993) Cation fluxes in the sap of *Sinapis alba* during floral transition. *Physiol Plant* 87: 353-358
- Havelange A, Bernier G, Jacquemard A** (1974) Descriptive and quantitative study of ultrastructural changes in the apical meristem of mustard in



- 
- transition to flowering. II. The cytoplasm, mitochondria and protoplastids. *J Cell Sci* 16: 421-432
- Havelange A, Lejeune P, Bernier G** (2000) Sucrose / cytokinin interaction in *Sinapis alba* at floral induction: a root-to-shoot physiological loop. *Physiol Plant* 109: 343-350
- Havelange A, Lejeune P, Bernier G, Kaur-Sawhney R, Galston AW** (1996) Putrescine export from leaves in relation to floral transition in *Sinapis alba*. *Physiol Plant* 96: 59-65
- Haywood V, Kragler F, Lucas WJ** (2002) Plasmodesmata. Pathways for protein and ribonucleoprotein signalling. *The Plant Cell* 14: S303-S325
- Hernández LF, Green PB** (1993) Transductions for the expression of structural pattern: analysis in sunflower. *Plant Cell* 5: 1725-1738
- Houssa C, Jacqumard A, Bernier G** (1990) Activation of replicon origins as a possible target for cytokinins in shoot meristems of *Sinapis*. *Planta* 181: 324-326
- Ishii T, Matsunaga T, Hayashi N** (2001) Formation of rhamnogalacturonan II-borate dimer in pectin determines cell wall thickness of pumpkin tissue. *Plant Physiol* 126: 1698-1705
- Ishii T, Matsunaga T, Pellerin P, O'Neill MA, Darvill A, Albersheim P** (1999) The plant cell wall polysaccharide rhamnogalacturonan II self-assembles into a covalently cross-linked dimer. *J Biol. Chem.* 274(19): 13098-13104
- Iwai H, Ishii T, Satoh S** (2001) Absence of arabinan in the side chains of pectic polysaccharides strongly associated with cell walls of *Nicotiana plumbaginifolia* non-organogenic callus with loosely attached constituent cells. *Planta* 213: 907-915
- Iwai H, Masaoka N, Ishii T, Satoh S** (2002) A pectin glucuronyltransferase gene is essential for intercellular attachment in the plant meristem. *PNAS*, 99(25): 16319-16324
- Iwai H, Usui M, Hoshino H, Kamada H, Matsunaga T, Kakegawa K, Ishii T, Satoh S** (2003) Analysis of sugars in squash xylem sap. *Plant Cell Physiol*, 44(6): 582-587
- Jack T** (2004) Molecular and genetic mechanisms of floral control. *The Plant cell* 16: S1-S17
- Jacqumard A** (1978) Histochemical localization of enzyme activity during floral evocation in the shoot apical meristem of *Sinapis alba*. *Protoplasma* 94: 315-324
- Jacqumard A, Houssa C, Bernier G** (1998) Control of the Cell Division Cycle Changes in the Shoot Meristem of *Sinapis alba* During the Transition to Flowering. In: Bryant JA, Chiatante D (eds) *Plant Cell Proliferation and its Regulation in Growth and Development*. Wiley, New York: 67-78
- Jacqumard A, Mikshe JP** (1971) Cell population and quantitative changes of DNA in the shoot apex of *Sinapis alba* during floral induction. *Bot Gaz* 132: 364-367
- Jarvis MC** (1984) Structure and properties of pectin gels in plant cell walls. *Plant Cell and Environment* 7: 153-164

- Jenkins J, Mayans O, Smith D, Worboys K, Pickersgill RW** (2001) Three-dimensional structure of *Erwinia chrysanthemi* pectin methylesterase reveals a novel esterase active site. *J of Mol Biol* 305: 951-960
- Johansson K, El-Ahmad M, Friemann R, Jörnvall H, Markovič O, Eklund H** (2002) Crystal structure of plant pectin methylesterase. *FEBS Letters* 514: 243-249
- Jiménez-Bermúdez S, Redondo-Nevado J, Muñoz-Blanco J, caballero JL, López-Aranda JM, Valpuesta V, Pliego-Alfaro F, Quesada MA, Mercado JA** (2002) Manipulation of strawberry fruit softening by antisense expression of a pectate lyase gene. *Plant Physiol* 128: 751-759
- Jones L, Seymour GB, Knox JP** (1997) Localization of pectic galactan in tomato cell walls using a monoclonal antibody specific to (1→4)-β-D-galactan. *Plant Physiol* 113: 1405-1412
- Kania T, Russenberger D, Peng S, Apel K, Melzer S** (1997) PPF1 promotes flowering in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 9: 1327-1338
- Kauss H, Hassid WZ** (1967) Enzymic Introduction of the Methyl Ester Groups of Pectin. *J Biol Chem* 242: 3449-3453
- Keller B** (1993) Structural cell wall proteins. *Plant Physiol* 101: 1127-1130
- Kim HU, Park BS, Jin YM, Chung TY** (1997) Promoter sequences of two homologous pectin esterase genes from chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*) and pollen-specific expression of the GUS gene driven by a promoter in tobacco plants. *Mol Cells* 7(1) : 21-27
- Knox PJ** (1992) Cell adhesion, cell separation and plant morphogenesis. *Plant J* 2: 137-141
- Kohorn BD** (2000) Plasma membrane-cell wall contacts. *Plant Physiol* 124: 31-38
- Kollmann R, Glockmann C** (1991) Studies on graft unions. III. On the mechanism of secondary formation of plasmodesmata at graft interface. *Protoplasma* 165: 71-85
- Lacoux J, Duval I, Dupre P, Guttierrez L, Lesueur S, Roger D, Laine E** (2003b) Activity of flax pectin methylesterase in transgenic tobacco pollen. *J Plant Physiol* 160(8): 977-979
- Lacoux J, Gutierrez L, Dantin F, Beaudoin B, Roger D, Laine E** (2003a) Antisense transgenesis of tobacco with a flax pectin methylesterase affects pollen ornamentation. *Protoplasma* 222(3-4) : 205-209
- Lang A** (1965) Physiology of flower initiation. In: Ruhland W (ed) *Encyclopedia Plant Physiology*. Springer, Berlin, pp 1379-1536
- Lejeune P, Bernier G, Kinet J-M** (1991) Sucrose levels in leaf exudate as a function of floral induction in the long day plant *Sinapis alba*. *Plant Physiol Biochem* 29: 153-157
- Lejeune P, Bernier G, Requier M-C, Kinet J-M** (1993) Sucrose increase during floral induction in the phloem sap collected at the apical part of the shoot of the long-day plant *Sinapis alba* L. *Planta* 190: 71-74

- 
- Lejeune P, Bernier G, Requier M-C, Kinet J-M** (1994) Cytokinins in phloem and xylem saps of *Sinapis alba* during floral induction. *Physiol Plant* 90: 522-528
- Lejeune P, Kinet J-M, Bernier G** (1988) Cytokinin fluxes during floral induction in the long day plant *Sinapis alba* L. *Plant Physiol* 86: 1095-1098
- Li Y-Q, Mareck A, Faleri C, Moscatelli A, Liu Q, Cresti M** (2002), Detection and localization of pectin methylesterase isoforms in pollen tubes of *Nicotiana tabacum* L. *Planta* 214: 734-740
- Liners F, Gaspar T, Van Cutsem P** (1994) Acetyl- and methyl- esterification of pectins of friable and compact sugar-beet calli: consequences for intercellular adhesion. *Planta* 192: 545-556
- Liners F, Letesson J-J, Didembourg C, Van Cutsem P** (1989) Monoclonal antibodies against pectin. *Plant Physiol* 91: 1419-1424
- Liners F, Thibault J-F, Van Cutsem P** (1992) Influence of the degree of polymerization of oligogalacturonates and of esterification pattern of pectin on their recognition by monoclonal antibodies. *Plant Physiol* 99: 1099-1104
- Liners F, Van Cutsem P** (1991) Immunocytochemical localization of homopolygalacturonic acid on plant cell walls. *Micron and Microscopica Acta* 22(3): 265-266
- Liners F, Van Cutsem P** (1992) Distribution of pectic polysaccharides throughout walls of suspension-cultured carrot cells, an immunocytochemical study. *Protoplasma* 170: 10-21
- Lucas WJ, Ding B, van der Schoot C** (1993) Plasmodesmata and the supracellular nature of plants. *New Phytol* 125: 435-476
- Lyndon RF** (1998) *The Shoot Apical Meristem: its Growth and Development*. Cambridge Univ Press, Cambridge
- MacDougall AJ, Needs PW, Rigby NM, Ring SG** (1996) Calcium gelation of pectic polysaccharides isolated from unripe tomato fruit. *Carbohydr Res* 293: 235-249
- Mareck A, Gaffé J, Morvan O, Alexandre C, Morvan C** (1995) Characterization of isoforms of pectin methylesterase of *Linum usitatissimum* using polyclonal antibodies. *Plant Cell Physiol* 36(3): 409-417
- Marfà V, Gollin D, Eberhard S, Mohnen D, Darvill A, Albersheim P** (1991) Oligogalacturonides are able to induce flowers to form on tobacco explants. *The Plant Journal* 1(2): 217-225
- Masuda S, Sakuta C, Satoh S** (1999) cDNA cloning of a novel lectin-like xylem sap protein and its root-specific expression in cucumber. *Plant Cell Physiol* 40(11): 1177-1181
- Matoh T, Takahashi M, Takabe K, Kobayashi M** (1998) Immunochemistry of rhamnogalacturonan II in cell walls of higher plants. *Plant Cell Physiol* 39: 483-491

- McCartney L, Ormerod AP, Gidley MJ, Knox JP** (2000) Temporal and spatial regulation of pectic (1→4)-β-D-galactan in cell walls of developing pea cotyledons: implications for mechanical properties. *The Plant J* 22(2): 105-113
- McMillan GP, Pérombelon MCM** (1995) Purification and characterization of a high pI pectin methyl esterase isoenzyme and its inhibitor from tubers of *Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum* cv. Katahdin. *Physiol and Mol plant Pathol* 46: 413-427
- Melzer S, Menzel G, Kania T** (1995) Molecular analysis of the transition to flowering in *Sinapis alba*. *FNL* 19: 28-46
- Menzel G, Apel K, Melzer S** (1996) Identification of two MADS box genes that are expressed in the apical meristem of the long-day plant *Sinapis alba* in transition to flowering. *Plant J* 9: 399-408
- Messiaen J, Cambier P, Van Cutsem P** (1997) Polyamines and pectins. I - ion exchange and selectivity. *Plant Physiol* 113: 387-395
- Messiaen J, Read ND, Van Cutsem P, Trewavas AJ** (1993) Cell wall oligogalacturonides increase cytosolic free calcium in carrot protoplasts. *J Cell Science* 104: 365-371
- Messiaen J, Van Cutsem P** (1994) Pectic signal transduction in carrot cells: membrane, cytosolic and nuclear responses induced by oligogalacturonides. *Plant Cell Physiol* 35(4): 677-689
- Messiaen J, Van Cutsem P** (1999) Polyamines and pectins. II. Modulation of pectic-signal transduction. *Planta* 208: 247-256
- Meyerowitz EM** (1999) Plants, animals and the logic of development. *Trends in Cell Biol, Millenium issue* 9(12): M65-M68
- Micheli F** (2001) Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends in Plant Science* 6(9): 414-419
- Micheli F, Holliger C, Goldberg R, Richard L** (1998) Characterization of the pectin methylesterase-like gene AtPME3: a new member of a gene family comprising at least 12 genes in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 220: 13-20
- Micheli F, Sundberg B, Goldberg R, Richard L** (2000) Radial distribution pattern of pectin methylesterases across the cambial region of hybrid aspen at activity and dormancy. *Plant Physiol* 124: 191-199
- Milyaeva E, Nikiforova V** (1996) Informational signaling in stem apical meristems of plants during transition to flowering. *FNL* 22: 26-33
- Milyaeva EL, Nikiforova VY** (1999) Carbohydrate specificity of stem-apex glycoproteins during plant transition to flowering. *Russ J of Plant Physiol* 46(2): 174-180
- Mollet J-C, Park S-Y, 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: 1737-1749
- Mouradov A, Cremer F, Coupland G** (2002) Control of flowering time: interacting pathways as a basis for diversity. *The Plant Cell*: S111-S130

- 
- Moustacas A-M, Nari J, Borel M, Noat G, Ricard J** (1991) Pectin methylesterase, metal ions and plant cell-wall extension. The role of metal ions in plant cell-wall extension. *Biochem. J.* 279: 351-354
- Mu J-H, Stains J, Kao T-H** (1994) Characterization of a pollen-expressed gene encoding a putative pectin esterase of *Petunia inflata*. *Plant Molecular Biology* 25: 539-544
- Murray MG, Thompson WF** (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* 8(19): 4321-5
- Nari J, Noat G, diamantidis G, Woudstra M, Ricard J** (1986) Electrostatic effects and the dynamics of enzyme reactions at the surface of plant cells. 3. Interplay between limited cell-wall autolysis, pectin methylesterase activity and electrostatic effects in soybean cell walls. *Eur J Biochem* 155: 199-202
- Nikiforova VJ, Milyaeva EL** (1995) Organogenesis peculiarities in the stem apices of *Rudbeckia bicolor* and *Perilla nankinensis* during transition to flowering in response to photoperiodic induction. *Russ J of Plant Physiol* 42(2): 163-169
- Nikiforova VJ, Sidorkina EV, Milyaeva EL** (1999) The control of plant transition to flowering by cell-wall active compounds. *Russ J of Plant Physiol* 46(5): 661-665
- O'Neill MA, Eberhard S, Albersheim P, Darvill AG** (2001) Requirement of borate cross-linking of cell wall rhamnogalacturonan II for Arabidopsis growth. *Science* 294: 846-849
- Orfila C, Huisman MM, Willats WG, van Alebeek GJ, Schols HA, Seymour GB, Knox JP** (2002) Altered cell wall disassembly during ripening of Cnr tomato fruit: implications for cell adhesion and fruit softening. *Planta*, 215(3): 440-447
- Orfila C, Knox JP** (2000) Spatial regulation of pectic polysaccharides in relation to pit fields in cell walls of tomato fruit pericarp. *Plant Physiol* 122: 775-781
- Ormenese S** (2001) Etude des communications intercellulaires symplasmiques au sein du méristème apical de tige de *Sinapis alba* L. au cours de la transition florale. Thèse de doctorat – Université de Liège (Ulg)
- Ormenese S, Havelange A, Bernier G, Van der Schoot C** (2002) The shoot apical meristem of *Sinapis alba* L. expands its central symplasmic field during the floral transition. *Planta* 215: 67-78
- Ormenese S, Havelange A, Deltour R, Bernier G** (2000) The frequency of plasmodesmata increases early in the whole shoot apical meristem of *Sinapis alba* L. during floral transition. *Planta* 211: 370-375
- Ormrod JC, Bernier G** (1990) Cell cycle patterns in the shoot apex of *Lolium temulentum* L. cv. Ceres during the transition to flowering following a single long-day. *J Exp Bot* 41: 211-216
- Pennel RI, Cronk QCB, Forsberg LS, Stöhr C, Snogerup L, Kjellbom P, McCabe PF** (1995) Cell-context signalling. *Phil Trans R Soc Lond* 350: 87-93

- Périlleux C, Bernier G** (2002) The control of flowering: do genetical and physiological approaches converge? In: O'Neill SD, Roberts JA (eds) Plant Reproduction, Annual Plant Reviews, Vol. 6. Sheffield Academic Press, Sheffield, pp. 1-32
- Pilling J, Willmitzer L, Fisahn J** (2000) Expression of a *Petunia inflata* pectin methylesterase in *Solanum tuberosum* L. enhances stem elongation and modifies cation distribution. *Planta* 210: 391-399
- Qi XY, Behrens BX, West PR, Mort AJ** (1995) Solubilization and partial characterization of extension fragments from cell-walls of cotton suspension cultured: evidence for a covalent cross-link between extension and pectin. *Plant Physiol* 108: 1691-1701
- Quentin M, Jauneau A, Morvan O, Mareck A, Gaffé J, Morvan C** (1997) Immunolocalization of pectin methylesterases in the hypocotyl tissues of flax. *Plant Physiol Biochem* 35(6): 475-482
- Raiola A, Camardella L, Giovane A, Mattei B, De Lorenzo G, Cervone F, Bellincampi D** (2004) Two *Arabidopsis thaliana* genes encode functional pectin methylesterase inhibitors. *FEBS Lett* 557(1-3): 199-203
- Recourt K, Ebbelaar MEM, Barbisan P, Laats MM, Wichers HW** (1992) Molecular characterization of bean pectin esterases and the expression during pod development. EMBL/GenBank accession N° X85216
- Redgwell RJ, MacRae E, Hallett I, Fisher M, Perry J, Harker R** (1997) *In vivo* and *in vitro* swelling of cell walls during fruit ripening. *Planta* 203: 162-173
- Reichelt S, Knight AE, Hodge TP, Baluska F, Samaj J, Volkmann D, Kendrick-Jones J** (1999) Characterization of the unconventional myosin VIII in plant cells and its localization at the post-cytokinetic cell wall. *The Plant J* 19(5): 555-567
- Reid JSG** (2000) Cementing the wall: cell wall polysaccharide synthesising enzymes. *Curr Op Plant Biol* 3: 512-516
- Reiter W-D** (1998) *Arabidopsis thaliana* as a model system to study synthesis, structure, and function of the plant cell wall. *Plant Physiol Biochem* 36(1-2): 167-176
- Reiter W-D, Chapple C, Somerville C** (1997) Mutants of *Arabidopsis thaliana* with altered cell wall polysaccharide composition. *The Plant Journal* 12(2): 335-345
- Ren C, Kermode AR** (2000) An increase in pectin methyl esterase activity accompanies dormancy breakage and germination of yellow cedar seeds. *Plant Physiol* 124: 231-242
- Richard L, Qin L-X, Gadal P, Goldberg R** (1994) Molecular cloning and characterization of a putative pectin methylesterase cDNA in *Arabidopsis thaliana* (L.). *FEBS Letters* 355: 135-139
- Ridley BL, O'Neill MA, Mohnen D** (2001) Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonides-related signaling. *Phytochemistry* 57: 929-967

- 
- Rigby NM, MacDougall AJ, Needs PW, Selvendran RR** (1994) Phloem translocation of a reduced oligogalacturonide in *Ricinus communis* L. *Planta* 193: 536-541
- Rinne PLH, van der Schoot C** (1998) Symplastic fields in the tunica of the shoot apical meristem coordinate morphogenetic events. *Development* 125: 1477-1485
- Robards AW, Lucas WJ** (1990) Plasmodesmata. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 41: 369-419
- Roberts K** (1990) Structures at the plant surface. *Curr Opin Cell Biol* 2: 920-928
- Roger D, Lacoux J, Lamblin F, Gaillet D, Dauchel H, Klein D, Balangé AP, David A, Lainé E** (2001) Isolation of a flax pectin methylesterase promoter and its expression in transgenic tobacco. *Plant Sc* 160: 713-721
- Ronnberg B, Fekadu M, Behboudi S, Kenne L, Morein B** (1997) Effects of carbohydrate modification of Quillaja saponaria Molina QH-B fraction on adjuvant activity, cholesterol-binding capacity and toxicity. *Vaccine* (17-18): 1820-6
- Roy S, Watada AE, Wergin WP** (1997) Characterization of the cell wall microdomain surrounding plasmodesmata in apple fruit. *Plant Physiol*: 114: 539-547
- Sachs RM, Hackett WP** (1983) Source-sink relationships and flowering. In : Meudt WJ (ed) *Strategies of Plant Reproduction*. Allanheld, Osmun, pp 263-272
- Salisbury FB, Ross CW** (1992) *Plant Physiology*, 4<sup>th</sup> edition. Wadsworth Publ Co, Belmont
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989) *Molecular Cloning: a laboratory manual* (2nd ed). CSH Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Satoh S** (1998) Functions of the cell wall in the interaction of plant cells : analysis using carrot cultured cells. *Plant Cell Physiol*, 39(4): 361-368
- Satoh S, Iizuka C, Kikuchi A, Nakamura N, Fujii T** (1992) Proteins and carbohydrates in xylem sap from squash root. *Plant Cell Physiol* 33(7): 841-847
- Scheres B** (2001) Plant cell identity. The role of position and lineage. *Plant Physiol* 125: 112-114
- Schmohl N, Pilling J, Fisahn J, Horst WJ** (2000) Pectin methylesterase modulates aluminium sensitivity in *Zea mays* and *Solanum tuberosum*. *Physiol Plant* 109: 419-427
- Sjolander A, van't Land B, Lovgren Bengtsson K** (1997) Iscoms containing purified Quillaja saponins upregulate both Th1-like and Th2-like immune responses. *Cell Immunol* 177(1): 69-76
- Skjot M, Pauly M, Bush MS, Borkhardt B, McCann MC, Ulvskov P** (2002) Direct interference with rhamnogalacturonan I biosynthesis in golgi vesicles. *Plant Physiol* 129(1): 95-102
- Steeves TA, Sussex IM** (1989) *Patterns in Plant Development*, 2nd edn. Cambridge Univ Press, Cambridge

- Stephenson MB, Hawes MC** (1994) Correlation of pectin methylesterase activity in root caps of pea root border cell separation. *Plant Physiol* 106 : 739-745
- Stolle-Smiths T, Beekhuizen JG, Kok MT, Pijnenburg M, Recourt K, Derksen J, Voragen** (1999) Changes in cell wall polysaccharides of green bean pods during development. *Plant Physiol* 121(2):363-72
- Sussex IM** (1989) Developmental programming of the shoot meristem. *Cell* 56: 225-229
- Talbott LD, Ray PM** (1992) Changes in molecular size of previously deposited and newly synthesized pea cell wall matrix polysaccharides. *Plant Physiol* 98: 369-379
- The *Arabidopsis* genome initiative** (2000) Sequence and analysis of chromosome 5 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408(6814): 823-6
- Thompson JE, Fry SC** (2000) Evidence for covalent linkage between xyloglucan and acidic pectins in suspension-cultured rose cells. *Planta* 211: 275-286
- Thonar C, Liners F, Van Cutsem P** (in press) Polymorphism and evolution of enzyme activity of cell wall esterases in the chicory root during the growing season. *J Exp Bot.*
- Tieman DM, Harriman RW, Ramamohan G, Handa AK** (1992) An Antisense Pectin Methylesterase Gene Alters Pectin Chemistry and Soluble Solids in Tomato Fruit. *Plant Cell* 4(6): 667-679
- Tran Than Van K, Toubart P, Cousson A, Darvill A, Gollin DJ, Chelf P, Albersheim P** (1985) Manipulation of the morphogenetic pathway of tobacco explants by oligosaccharins. *Nature* 314: 615-617
- Tucker GA, Robertson NG, Grierson D** (1982) Purification and changes in activities of tomato pectinesterase isoenzymes. *J Sci Food Agric* 33: 396-400
- van der Schoot C, Rinne PLH** (1999) Networks for shoot design. *Trends Plant Sci* 4: 31-37
- Vincken J-P, Schols HA, Oomen RJFJ, McCann MC, Ulvskov P, Voragen AGJ, Visser RGF** (2003) If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. *Plant Physiol*, 132: 1781-1789
- Vreeland V, Morse SR, Robichaux RH, Miller KL, Hua ST, Laetsch WM** (1989) Pectate distribution and esterification in *Dubautia* leaves and soybean nodules, studied with a fluorescent hybridization probe. *Planta* 177: 435-446
- Wagner E, Normann J, Albrechtová JTP, Walczysko P, Bonzon M, Greppin H** (1998) Electrochemical-hydraulic signalling in photoperiodic control of flowering: is "florigen" a frequency-coded electric signal. *FNL* 26: 62-74



- 
- Wagner TA, Kohorn BD** (2001) Wall-associated kinases are expressed throughout plant development and are required for cell expansion. *Plant Cell* 13: 303-318
- Wakeley PR, Rogers HJ, Rozycka M, Greenland AJ, Hussey PJ** (1998) A maize pectin methylesterase-like gene, ZmC5, specifically expressed in pollen. *Plant Mol Biol* 37: 187-192
- Wen F, Zhu Y, Hawes MC** (1999) Effect of pectin methylesterase gene expression on pea root development. *The Plant Cell* 11: 1129-1140
- Willats WG, McCartney L, Steele-King CG, Marcus SE, Mort A, Huisman M, van Alebeek GJ, Schols HA, Voragen AG, Le Goff A, Bonnin E, Thibault JF, Knox JP** (2004) A xylogalacturonan epitope is specifically associated with plant cell detachment. *Planta* 218(4): 673-81
- Willats WGT, Gilmartin PM, Mikkelsen JD, Knox JP** (1999a) Cell wall antibodies without immunization: generation and use of de-esterified homogalacturonan block-specific antibodies from a naive phage display library. *The Plant J* 18(1): 57-65
- Willats WGT, Limberg G, Buchholt HC, van Alebeek G-J, Benen J, Christensen TMIE, Visser J, Voragen A, Mikkelsen JD, Knox JP** (2000a) Analysis of pectic epitopes recognised by hybridoma and phage display monoclonal antibodies using defined oligosaccharides, polysaccharides, and enzymatic degradation. *Carbohydr Res* 327: 309-320
- Willats WGT, Marcus SE, Knox JP** (1998) Generation of a monoclonal antibody specific to (1→5)- $\alpha$ -L-arabinan. *Carbohydrate Res* 308: 149-152
- Willats WGT, McCartney L, Knox JP** (2001c) *In-situ* analysis of pectic polysaccharides in seed mucilage and at the root surface of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 213: 37-44
- Willats WGT, McCartney L, Mackie W, Knox JP** (2001a) Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Mol Biol*, 47(9): 9-27
- Willats WGT, Orfila C, Limberg G, Buchholt HC, van Alebeek G-J, Voragen AGJ, Marcus SE, Christensen TMIE, Mikkelsen JD, Murray BS, Knox JP** (2001b) Modulation of the degree and pattern of methyl-esterification of pectic homogalacturonan in plant cell walls. *J Biol Chem*, 276 (22): 19404-19413
- Willats WGT, Steele-King CG, Marcus SE, Knox JP** (1999b) Side chains of pectic polysaccharides are regulated in relation to cell proliferation and cell differentiation. *The Plant J* 20(6): 619-628
- Willats WGT, Steele-King CG, McCartney L, Orfila C, Marcus SE, Knox JP** (2000b) Making and using antibody probes to study plant cell walls. *Plant Physiol Biochem* 38(1/2): 27-36
- Wolf S, Grsic-Rausch S, Rausch T, Greiner S** (2003) Identification of pollen-expressed pectin methylesterase inhibitors in *Arabidopsis*. *FEBS Lett* 555(3): 551-5
- Xonocostle-Cazares B, Xiang Y, Ruiz-Medrano R, Wang H-L, Monzer J, Yoo B-C, McFarland KC, Franceschi VR, Lucas WJ** (1999) *Plant*

paralog to viral movement protein that potentiates transport of mRNA into the phloem. *Science* 283: 94-98

**Yamaya T, Hayakawa T, Tanasawa K, Kamachi K, Mae T, Ojima K** (1992) Tissue distribution of glutamate synthase and glutamine synthetase in rice leaves. Occurrence of NADH-dependent glutamate synthase protein and activity in the unexpanded, nongreen leaf blades. *Plant Physiol* 100: 1427-1432

**Zhan D, Janssen P, Mort AJ** (1998) Scarcity or complete lack of single rhamnose residues interspersed within the homogalacturonan regions of *citrus* pectin. *Carbohydr res* 308: 373-380



# **Étude immunocytochimique des pectines du méristème de *Sinapis alba* L. et de leurs modifications lors de la transition florale**

Par Stéphanie Sobry

## **Résumé :**

Les pectines de la paroi cellulaire végétale sont impliquées dans un grand nombre de processus physiologiques. Toutefois, la fonction exacte des pectines - au niveau structural comme dans le contexte de la biologie et du développement cellulaire - est toujours un sujet de controverses. D'autre part, des observations soulèvent la question du rôle des fragments pectiques dans le contrôle de la floraison (Marfà *et al.*, 1991) et les changements de communication intercellulaire observés au sein du méristème apical lors de la transition florale (Ormenese *et al.*, 2000, 2002) impliquent des modifications biochimiques de la structure de la paroi cellulaire. Comme décrit par Liners *et al.* (1994), nous avons étudié par immunocytochimie (microscopie électronique et confocale) la nature, la localisation et le contenu en pectines dans des méristèmes de plantes de *Sinapis* en conditions végétatives ainsi que lors de la transition florale. Une diminution importante mais transitoire du contenu en homogalacturonanes de la paroi cellulaire est observée au cours des premières heures de la transition florale. Cette diminution du contenu en pectines doit être la conséquence d'une libération d'enzymes pectolytiques dont les pectine méthylestérases (PME) au niveau du méristème. Afin d'étudier l'expression des PME dans le méristème lors de la transition florale, nous avons produit et caractérisé un polysérum contre une zone extrêmement conservée des gènes de PME de *S. alba*.

## **Immunocytochemical study of pectins and pectin modifications at floral transition in meristems of *Sinapis alba* L.**

By Stéphanie Sobry

## **Abstract :**

Plant cell wall pectins are implicated in a large number of physiological processes. However, the exact functions of pectins – at a structural level as well as in the context of cell biology and development - are still debatable. On the other hand, observations raise the question as to whether pectic fragments are involved in the *in vivo* control of flowering (Marfà *et al.*, 1991) and communication changes between the cells of the apical meristem in floral transition (Ormenese *et al.*, 2000, 2002) imply biochemical modifications of the cell wall structure. Using immunocytochemistry (electron and confocal as described in Liners *et al.* (1994), we studied the nature, localization and content of pectins in meristems of *Sinapis* in vegetative plants and at floral transition. A marked but transient decrease of the homopolygalacturonic content of the cell wall occurs in the first hours of the transition to flowering. This pectin content decrease must be due to the release of pectolytic enzymes like pectin methylesterase (PME) in the meristem. To study PME expression in the meristem at floral transition, we raised and characterized polyclonal antibodies to highly conserved sequences of *S. alba* PME genes.

Dissertation doctorale en Sciences Biologiques  
(Ph.D. thesis in Biological Sciences)

2004

Unité de recherches en Biologie cellulaire Végétale (Prof. P. Van Cutsem)  
Promoteur (Advisor) : Prof. P. Van Cutsem