



HAL
open science

Rôle du rhamnogalacturonane de type II dans l'élongation cellulaire

Marie Dumont

► **To cite this version:**

Marie Dumont. Rôle du rhamnogalacturonane de type II dans l'élongation cellulaire. Biologie végétale. Université de Rouen Normandie, 2015. Français. NNT : . tel-01978296

HAL Id: tel-01978296

<https://normandie-univ.hal.science/tel-01978296>

Submitted on 11 Jan 2019

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

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



UNIVERSITE DE ROUEN
UFR DES SCIENCES ET TECHNIQUES

Pour l'obtention du titre de Docteur de Normandie Université
Ecole doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement
Discipline : Biologie – Spécialités : Biochimie et physiologie végétales



Thèse soutenue le 10 juillet 2015
Par Marie DUMONT

*Rôle du rhamnogalacturonane de type II
dans l'élongation cellulaire*

Devant le jury composé de :

M. Pierre BALDET	Chargé de recherches HDR, INRA de Bordeaux	Rapporteur
M. Christophe d'HULST	Professeur, Université de Lille	Rapporteur
M. Alan MARCHANT	Maître de conférences, University of Southampton	Examineur
M. Xavier PANNECOUCKE	Professeur, INSA de Rouen	Examineur
M. Jérôme PELLOUX	Professeur, Université d'Amiens	Examineur
M. Boris VAUZEILLES	Directeur de recherche, ICSN Gif-sur-Yvette	Examineur
M. Arnaud LEHNER	Maître de conférences, Université de Rouen	Membre invité
M. Patrice LEROUGE	Professeur, Université de Rouen	Directeur
M. Jean-Claude MOLLET	Professeur, Université de Rouen	Co-directeur

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire Glyco-MEV EA4358, situé à Mont Saint Aignan, co-dirigé par les Prs. Patrice Lerouge et Azeddine Driouich. Ces travaux ont bénéficié d'un financement par le programme européen Interreg IV, et fait partie du projet TransChannelWallnet en collaboration avec les universités d'Amiens et de Southampton.

Je remercie en premier lieu mes rapporteurs M. Pierre Baldet, chargé de recherches à l'INRA de Bordeaux et M. Christophe D'Hulst, professeur à l'université de Lille 1, pour avoir accepté d'évaluer mon mémoire de thèse. Merci également à tous les membres du jury pour leur présence à ma soutenance et pour l'examen de mes travaux de recherche.

Merci à l'école doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé et Environnement (EdNBISE) qui m'a permis de suivre plusieurs formations de qualité et a participé aux financements de mon séjour scientifique et aux congrès internationaux auxquels j'ai pu assister au cours de ces trois années de thèse.

Tant de personnes m'ont accompagnée pendant ma formation et méritent d'être citées, alors je ne me dérogerai pas à la règle des longs remerciements et vais essayer de n'oublier personne :

A mes directeurs de thèse, Patrice Lerouge et Jean-Claude Mollet : Patrice, lorsque je vous écoutais sagement en cours de biochimie jamais je ne me serai imaginée un jour faire une thèse dans ce domaine, vous avez beau le nier, vous impressionnez les étudiants. Mais je crois que le destin est bien fait car j'ai beaucoup appris durant cette thèse, j'ai apprécié votre dynamisme, vos « Marie ! Au boulot ! Ca donne quoi les résultats ? » qui m'ont poussée à toujours vouloir avancer plus vite, nos discussions scientifiques... je pense avoir mûri même si j'ai encore du mal à savoir quand je dois prendre vos blagues au second degré...

Jean-Claude, vous avez formé un bon duo avec Patrice car certainement plus calme, je pouvais me tourner vers vous pour les questions de physiologie. Merci de m'avoir formée aux rudiments du tube pollinique et pour toutes les relectures d'articles, résumés, posters...

A Arnaud, j'ai beaucoup apprécié de pouvoir discuter et plaisanter avec toi librement sans ressentir de hiérarchie chef-étudiant. Merci de m'avoir soutenu devant les grands chefs pour leur expliquer que la pratique n'est pas toujours aussi simple que la théorie et d'avoir souffert à mes côtés de couper des racines à longueur de journée.

Remerciements

A Azeddine, merci de nous donner ce goût de la science à l'internationale, je crois que c'est la partie de mon cursus que j'ai préférée, communiquer en anglais, collaborer pour partager ses connaissances, ça c'est la recherche ! Vous m'avez permis de réaliser mon stage de recherche de Master 1 en Crète et ce fût une expérience inoubliable. Enfin c'est grâce à vous que j'ai fait les plus belles rencontres...

A Muriel la wonderwoman du labo, je vous l'ai déjà dit mais vous êtes un modèle de femme moderne, bosseuse et maman aussi, je pense que vous avez un super pouvoir caché (est ce que vous dormez la nuit ?). Merci pour votre aide au MALDI, vos relectures, votre bonne humeur...

ATTTCGCTAAA...pour leur aide en biologie moléculaire, entourées de montagnes de dossiers qui renferment des milliers de séquences d'acides nucléiques, merci à Marie Christine et à Gaëlle.

A tous les membres du laboratoire, Maité, Marie-Laure, Aurélie, Bruno (tu as rejoint les biochimistes il y a plus d'un an et apportes beaucoup de ta bonne humeur, de ta pédagogie au labo. Une bonne recrue ^^ !), Elodie (pour ton « fort-parler » et tes conseils), Alain, Estelle (dire que les garçons ont échangé la porte de ton bureau avec une autre plus petite et tourné tous tes meubles contre le mur, caché tes balais,...mais tu prends toujours leurs pitreries avec le sourire), Carole Burel (la maman du labo, tes conseils en protéomique sont toujours bons à prendre), Carole Plasson (discrète, tu es pourtant toujours prête à nous aider dans nos manips) Laurence, Philippe.

Certaines personnes sont devenues indispensables au labo : Gérald, tu es comme un grand frère pour nous, très attentionné, un peu macho mais c'est aussi ce qui te rend unique !...Rien de mieux qu'un ptit verre au Colbert avec Sophie, Mme étiquette, pour nous rassurer sur les aléas de la thèse et nous apprendre les derniers potins.

Grâce au programme TransChannelWallnet j'ai eu grand plaisir à collaborer avec Sophie Bouton, Valérie Lefebvre, Jérôme Pelloux, Ludivine Hocq, Alan Marchant, Przemysław Ociepa,...et partagé de très bons moments lors des trois workshops organisés dans les trois universités partenaires. Merci à toutes les personnes qui ont participé et animé ces rencontres.

A Panos Kalaitzis et Charlie Anderson qui m'ont accueilli dans leur laboratoire à l'occasion de mon stage de recherche de Master 1 et d'un séjour scientifique...la science n'a pas de frontière.

Remerciements

A Denis Falconet, de l'université de Grenoble, et Corinne Bourhis-Loutelier, du laboratoire COBRA, pour leur aide technique.

Aux trois stagiaires de L3 que j'ai eu plaisir à encadrer et qui m'ont donné un bon coup de main : Manon, Mathilde et Mélanie.

A mes compagnons de bureau : tout le monde n'a pas la chance de travailler avec le (futur) Dr. Shepherd en face de soi ! Merci d'avoir partagé de bons fous rires, des parties de bowling aux matchs de baseball improvisés dans le bureau (même si je ne sais pas viser je sais)...bonne chance pour la suite. Rim, la belle libanaise du labo, nous étions déterminées à avoir notre place en thèse...nous l'aurons eue toutes les deux et en se serrant les coudes. Tu as pris ton projet de thèse en main et tu vas tous les impressionner! (J'attends la recette de ton merveilleux gâteau à la mozzarella, et tes secrets de manucure ;)). A Gaëtan, pour tes bulletins météo, désolée de n'avoir pu t'en apprendre plus sur le RG-II lors de ton master car tu en savais plus que moi qui commençais, mais maintenant tu gères l'EPO ! Mais qui viendra vous servir le thé maintenant ???

A mon chouchou ! Tu m'as inondée de chocolat, de m&m's et de blagues carambar merci pour toutes ces petites attentions qui vont me manquer, hey attends, tu connais celle-là ? Pourquoi Michaël ouvre la porte ?...Parce que Jack sonne. (Jackson) ☺

Oh ! Doux Jésus ! Tu te seras reconnu, Alexis, merci pour tes cours de cuisine, apprends à aimer la Normandie, car flash info : elle le vaut bien et je suis sûre qu'elle te manquera un jour. Ma ptite Ferdousse, toi aussi tu t'affirmes peu à peu et tu n'as plus besoin de nous, c'est toi qui maîtrises le pollen maintenant ! Ton rire saugrenu résonnant dans les couloirs va me manquer...mais pas tes massages ;))). A Christelle, tu m'as beaucoup aidé pour maîtriser les cultures de pollen qui me faisaient perdre la tête. Et tu es devenue une amie avec qui je peux parler de tout. J'espère avoir pu t'aider aussi. Yes, you can! A François, pour tous tes conseils en biochimie. A Jess pour tes mots rassurants ; Julie pour nos joggings en forêt ; Youssef (M. biscotto) un cœur d'artichaut caché derrière de gros muscles ; à l'expatrié de la cuvée 2012, Florent, qui débarque parfois d'Afrique du Sud avec sa crinière blonde et à Abdoul, the survivor, tu peux avoir la palme d'or de la patience. Merci à vous tous qui rendez ce labo vivant !

Aux anciens doctorants du labo...docteurs maintenant et aux post-docs, Marco, Flavien, Bérengère, Eric, Abder, Barbara, Aline, Caroline, Maxime, Rajinou, qui nous ont donnés de

Remerciements

bons conseils, transmis beaucoup de choses (à part les règles de sécurité du labo, hein Marco !) et surtout le secret de la réussite : travailler dans une bonne ambiance !

Cette page va être certainement difficile à tourner...

A mes parents, car c'est bien sûr grâce à vous que j'ai pu aller au bout de mes études. Un énorme MERCI, et bravo de m'avoir toujours encouragé à continuer sans vraiment comprendre ce que je faisais. Maman, je ne suis pas vraiment « médecin des plantes » mais pourquoi pas, je suis vraiment désolée de n'avoir su vous expliquer ce que je faisais dans ce labo et dans quel but... rendez-vous à ma soutenance orale, vous saurez tout !

A toute ma famille, papy Lulu, mamie Roro, Jeanne, René, Audrey, Tony, tatas, tontons, cousins, cousines pour nos retrouvailles familiales qui font du bien.

A Armanda e Adriano, grazie per il vostro sorriso, vostra gioia, grazie armanda per la cucina italiana che è squisita (un giorno saprò fare la pizza come te !) non potevo sperare migliori suoceri.

Un'altra storia ha cominciato tre anni fa e questa sta solo per cominciare. GlycoMEV ha ancora fatto il ruolo d'agenzia matrimoniale... Mi hai aiutato tanto a fare le buone scelte durante la tesi anche al telefono, grazie per l'attesa di tre anni, lo so che anche per te è stato difficile e soprattutto di supportami ! E anche se ho paura di diventare una « parigina », questa nuova pagina la torno volentieri con te, l'italiano vero...

PREAMBULE

La paroi pecto-cellulosique entoure chaque cellule végétale. Elle assure sa morphologie, sa structure et constitue une barrière physique et chimique contre les stress biotiques et abiotiques (Carpita & Gibeaut, 1993). En apparence rigide, la paroi reste néanmoins extensible, permettant la croissance cellulaire, et est ponctuée de plasmodesmes facilitant les communications intercellulaires (Lodish *et al.*, 2000). La paroi est aussi une source nutritive importante pour les Hommes et les animaux, et une matière première pour les industries du textile, du papier, agro-alimentaires, cosmétiques, ainsi que pour la production de biofuel (Somerville, 2007).

De par son importance, la connaissance des voies de biosynthèse des différents éléments constitutifs de la paroi est donc nécessaire. Plusieurs approches ont été développées, avec d'une part, la génétique fonctionnelle qui a permis d'allouer une fonction à un gène muté et a contribué à déterminer certaines étapes de la biosynthèse de composés pariétaux comme la cellulose, le xyloglucane (XyG) ou encore les pectines en général (Fagard *et al.*, 2000 ; Zabortina *et al.*, 2008 ; Atmodjo *et al.*, 2013). D'autre part, une cartographie de la répartition et de la dynamique des constituants pariétaux a pu être réalisée par immunocytochimie couplée à de la microscopie, grâce à l'utilisation d'anticorps monoclonaux. Actuellement, 180 anticorps monoclonaux sont disponibles pour l'étude de la paroi (<http://www.WallMabdb.net>). Cependant le rhamnogalacturonane de type II (RG-II), polysaccharide pectique le plus complexe de la paroi, apparaît comme une limite à l'utilisation de ces méthodes d'étude. Son rôle structural et fonctionnel dans la paroi est incontestable mais plusieurs difficultés nuisent à son étude. D'une part, les mutants homozygotes affectés dans la biosynthèse du RG-II sont majoritairement létaux et d'autre part, seuls deux anticorps dirigés contre ce polysaccharide ont pu être développés (Matoh *et al.*, 1998 ; Williams *et al.*, 1996), mais les épitopes précis reconnus par ces sondes restent encore inconnus.

C'est dans ce contexte qu'a débuté mon projet de thèse. Dans un premier temps, j'ai analysé un mutant affecté dans la synthèse d'une sialyltransférase-like (SiaT-like) potentiellement impliquée dans la synthèse du RG-II. La suite du travail a consisté à développer des approches alternatives à l'utilisation d'anticorps et à la génétique fonctionnelle pour l'étude du RG-II. Ainsi, nous avons développé d'une part la technique dite de « click chemistry » qui permet de s'affranchir de l'emploi d'anticorps. Finalement, nous avons eu recours à des

Préambule

analogues fluorés de sucres, inhibiteurs putatifs de transférases, comme alternative à la génétique fonctionnelle.

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS	1
LISTE DES FIGURES	7
LISTE DES TABLEAUX	8
INTRODUCTION.....	11
I. La paroi primaire végétale : composition et biosynthèse	13
1. Les polysaccharides pariétaux.....	14
a. Les β -glucanes : structure et synthèse.....	14
b. Les hémicelluloses	16
c. Les pectines.....	17
2. Les protéines pariétales	21
a. Les protéines structurales.....	21
b. Les enzymes de la paroi primaire.	24
3. Biosynthèse golgienne des hémicelluloses et des pectines	28
a. Biosynthèse des précurseurs : les nucléotides-sucres	28
b. Le transport des nucléotides-sucres	29
c. Biosynthèse golgienne du xyloglucane et des pectines.....	30
4. Organisation et interactions des polymères dans la paroi	34
a. Le réseau cellulose/hémicellulose.....	35
b. La place des pectines...révisée au cours du temps.	35
c. Les minéraux dans la paroi	38
II. Le rhamnogalacturonane de type II : structure et propriétés	39
1. Structure primaire.....	39
2. Structure 2D et 3D du RG-II <i>in muro</i>	40
3. Biosynthèse du RG-II.....	43
a. Les nucléotides-sucres rares ou spécifiques du RG-II	43
b. Les glycosyltransférases	46
4. Fonctions physiologiques du RG-II	47
a. Approche par génomique fonctionnelle : approche structure-fonction.....	48
b. Effets d'une déficience en bore.....	53
c. Approche pharmacologique	55
III. Nos modèles d'étude	56
1. Le tube pollinique : modèle d'étude de la paroi primaire	56
a. Les β -glucanes	57
b. Les hémicelluloses	58
c. Les pectines.....	58

d.	Les glycoprotéines	59
e.	Calcium et bore	60
2.	La racine d' <i>Arabidopsis thaliana</i> : un modèle pour l'étude de la croissance cellulaire.....	63
a.	Rôles et architecture de la racine	63
b.	Un modèle pour l'étude de la croissance cellulaire	65
IV.	Approches alternatives.	65
1.	Le marquage métabolique de glucides par « click chemistry » : vers une alternative à l'utilisation d'anticorps ?.....	65
a.	Principe de la « click-chemistry ».....	65
b.	La « click chemistry » appliquée à la biologie.....	66
c.	Et chez les organismes végétaux ?.....	68
2.	Les inhibiteurs de voies glucidiques	70
a.	Les sucres désoxy	70
b.	Les sucres fluorés.....	70
V.	Objectifs de travail	73
	RESULTATS	75
	Article 1. Rôle du rhamnogalacturonane de type II dans l'élongation du tube pollinique : implication d'une sialyltransférase-like putative.....	77
	Résultats complémentaires : complémentation pollen-spécifique par Floraldip.....	93
	Article 2. Imagerie du rhamnogalacturonane de type II par « click chemistry »	95
	Article 3. L'inhibition de la fucosylation des composés pariétaux par traitement au 2-fluoro 2-désoxy fucose provoque un défaut de l'élongation racinaire.	129
	Résultats complémentaires : effets du 2F-Fuc sur la croissance du tube pollinique d' <i>Arabidopsis</i>	178
	MATERIEL ET METHODES	181
1.	Matériel biologique et conditions de culture	183
2.	Techniques de biologie moléculaire.....	186
3.	Techniques d'histochimie.....	195
4.	Techniques de biochimie.....	201
5.	Analyses d'image et statistiques.....	206
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	208
1.	Vers une identification des glycosyltransférases spécifiques de la voie de biosynthèse du RG-II	210
2.	Vers une localisation précise et dynamique du RG-II.....	211
3.	Altération de la structure du RG-II : approche pharmacologique	213
4.	Une fonction du bore à reconsidérer ?.....	215
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	221
	ANNEXES	249
	Liste des amorces utilisées	249

Protocole 1.....	250
Protocole 2	257
CV.....	269

LISTE DES ABREVIATIONS

Ace : Acide acérique, 3-C-carboxy-5-désoxy-L-xylose

ADIBO : AzaDIBenzylcycloOctyne

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADNc : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire

ADN-T : Acide DésoxyriboNucléique de Transfert

AIR : Résidu Insoluble à l'Alcool (*Alcohol Insoluble Residue*)

Api : Apiose

AG-I : ArabinoGalactane de type I

AG-II : ArabinoGalactane de type II

AGP : ArabinoGalactane-Protéine

Ara : Arabinose

D-Ara-N₃ : 5-azido 5-deoxy D-arabinose

Ara 5-P : Arabinose-5-phosphate

Arabidopsis : *Arabidopsis thaliana*

ARN : Acide RiboNucléique

ARNi : Acide RiboNucléique interférant

AXS : UDP-D-apiose/UDP-D-xylose synthase

BCN : BiCycle[6.1.0]Nonyne

BET : Bromure d'ETHidium

BY-2 : Bright Yellow-2

CAZy : Carbohydrate-Active enZyme

CESA : CELLulose Synthase

CKS : CMP-KDO Synthetase

CMP : Cytidine MonoPhosphate

CP : Cycle seuil (*Crossing Point*)

CRISPR : Courtes répétitions en palindrome regroupées et régulièrement espacées (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*)

CSL : Cellulose Synthase-Like

dGlc : DésoxyGlucose (*deoxyglucose*)

Dha : Acide 3-désoxy-D-lyxo-hept-2-ulosonique

DHB : Acide 2,5-DiHydroxyBenzoïque

DIBO : DiBenzocycloOctyne

DIFO : DiFluorocycloOctyne

DM : Degré de Méthylestérification

dNTP : DésoxyNucléotide 5' TriPhosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

EGase : *Endo*- β -(1 \rightarrow 4)-Glucanase

EPGase : *Endo*- α -(1 \rightarrow 4)-PolyGalacturonase

ER : Réticulum Endoplasmique (*Endoplasmic Reticulum*)

FID : Détecteur à Ionisation de Flamme (*Flame Ionization Detector*)

FITC : Fluorescéine IsoThioCyanate

Fuc : Fucose

Fuc-Al : Fucose-Alcyne

FucT : FucosylTransférase

Gal : Galactose

GalA : Acide Galacturonique

GalT : GalactosylTransférase

GalAT : GalacturonosylTransférase

GC : Chromatographie en phase gazeuse (*Gaz Chromatography*)

GC-EIMS : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en impact électronique (*Gaz-Chromatography-Electron Impact Mass Spectrometry*)

GDP : Guanosine DiPhosphate

GIPCs : Glycosyl Inositol Phosphoryl Céramides

Glc : Glucose

GlcA : Acide glucuronique

GME : GDP-D-mannose-3,5-épimérase

GPI : GlycosylPhosphatidylInositol

GRP : Protéine Riche en Glycine (*Glycin Rich Protein*)

GUS : β -glucuronidase

GT : GlycosylTransférase

HG : HomoGalacturonane

His : Histidine

HRGP : Glycoprotéine riche en hydroxyproline (*Hydroxyprolin Rich GlycoProtein*)

Hyp : Hydroxyproline

ICSN : Institut de Chimie des Substances Naturelles

Kdo : Acide 3-désoxy-D-*manno*-oct-2-ulosonique

Kdo-N₃ : 8-azido 8-deoxy Kdo

Kdo 8-P: Kdo 8-phosphate

LB: Bouillon Lysogène (*Lysogeny Broth*)

Lys : Lysine

MALDI-TOF-MS : Spectrométrie de masse par désorption/ionisation laser assistée par matrice couplée à un temps de vol (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight-Mass Spectrometry)

Man: Mannose

MGP4: *Male Gametophyte Defective 4*

MS: Murashige and Skoog

NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide

NASC: Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre

NeuAc: Acide *N*-acétylNeuraminique

O-AcT : O-AcétylTransférase

2-*O*-Me-Fuc : 2-*O*-methyl L-fucose

2-*O*-Me-Xyl : 2-*O*-methyl D-xylose

OT : OligosaccharylTransférase

PAE : Pectines AcétylEstérase

PAGE : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (*Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

PBS : Tampon phosphate salin (*Phosphate Buffer Saline*)

PCR : Réaction de polymérisation en chaîne (*Polymerase Chain Reaction*)

PG : PolyGalacturonase

PEP : PhosphoEnol Pyruvate

PLL : Pectate Lyase-Like

PM : Membrane plasmique (*Plasma Membrane*)

PM-CW : Point d'attachement membrane plasmique-paroi cellulaire (*Plasma Membrane-Cell Wall*)

PME : Pectine MéthylEstérase

PMEI : Inhibiteur de Pectine MéthylEstérase (*Pectin MethylEsterase Inhibitor*)

Pro : Proline

PRP : Protéine Riche en Proline (*Prolin Rich Protein*)

rDNase : DésoxyriboNucléase recombinante (*recombinant DesoxyriboNuclease*)

RG-I : RhamnoGalacturonane de type I

RG-II : RhamnoGalacturonane de type II

RhaT : RhamnosylTransférase

Rha : Rhamnose

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

RNase : RiboNucléase

RT-qPCR : PCR quantitative en temps réel (*Real Time quantitative PCR*)

S4B : Pontamine FastScarlet 4B

SDS-PAGE : Electrophorèse sur un gel de polyacrylamide contenant du dodécylsulfate de sodium (*Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*)

Ser : Sérine

SiaT : SialylTransférase

SV : Vésicule de sécrétion (*Secretion Vesicle*)

TBE : Tris-borate-EDTA

TBS : Tampon tris salin (*Tris Buffer Saline*)

TBST : TBS supplémenté avec 0,1% de Tween-20

TFA : Acide TriFluoroacétique (*TriFluoroacetic Acid*)

Tm : Température de fusion (*melting Temperature*)

Tyr : Tyrosine

UDP : Uridine DiPhosphate

UV : Lumière Ultra-Violette

Val : Valine

XGA : Xylogalacturonane

XTH : Xyloglucane endoTransglucosidase/Hydrolase

XyG : XyloGlucane

Xyl : Xylose

XylT : XylosylTransférase

Yariv : β -glucosyl-Yariv

Ions :

Al²⁺ : Aluminium Ca²⁺ : Calcium Eu³⁺ : Europium Nd³⁺ : Néodyme Pr³⁺ : Praséodyme

Ba²⁺ : Barium Ce³⁺ : Cérium La³⁺ : Lanthane Pb²⁺ : Plomb Sr²⁺ : Strontium

Unités :

Da, kDa : Dalton, KiloDalton

L, mL, μ L : Litre, millilitre, microlitre

Pb, kb : Paire de base, kilobase

s, min, h : Seconde, minute, heure

m, cm, mm, μ m, nm : Mètre, centimètre, millimètre, micromètre, nanomètre

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : La paroi primaire des Eudicotylédones.	13
Figure 2 : Modèle de synthèse de la cellulose.	15
Figure 3 : Structure du xyloglucane.	17
Figure 4 : Représentation schématique des principales pectines de la paroi primaire des Eudicotylédones.	18
Figure 5 : Structure et organisation des homogalacturonanes.	19
Figure 6 : Structure du squelette et des différentes chaînes latérales du RG-I.	20
Figure 7 : Représentation schématique d'une extensine de tomate arborant une liaison intramoléculaire isodityrosine.	22
Figure 8 : Structure des arabinogalactane-protéines (AGPs).	23
Figure 9 : Représentation schématique d'une protéine riche en proline (PRP) de soja (A) et d'une protéine riche en glycine (GRP) de pétunia (B)..	24
Figure 10 : Représentation schématique de l'action des PME et de leur inhibiteur PMEI dans la formation d'un gel pectique.	25
Figure 11 : Mode d'action des XTHs.	26
Figure 12 : Le relâchement pariétal par les expansines.	28
Figure 13 : Principales voies de synthèse et d'interconversion des nucléotides-sucres chez les plantes.	29
Figure 14 : Biosynthèse des pectines selon deux modèles hypothétiques.	33
Figure 15 : Evolution du modèle structural de la paroi primaire.	35
Figure 16 : Représentation schématique de la structure macromoléculaire des pectines.	37
Figure 17 : Liaisons pectiques <i>in muro</i>	38
Figure 18 : Structure primaire du RG-II. Le RG-II est formé d'une chaîne de GalA substituée par 4 chaînes A, B, C, D.	40
Figure 19 : Représentation schématique de la formation du dimère de RG-II en fonction des conditions du milieu.	42
Figure 20 : Modélisation 3D du monomère (A) et du dimère de RG-II (B)..	42
Figure 21 : Les étapes de la biosynthèse du CMP-Kdo.	44
Figure 22 : Structure de l'acide sialique, du Kdo et du Dha.	47
Figure 23 : Phénotype du mutant <i>mur1</i>	49
Figure 24 : Représentation schématique du rôle de BOR2 dans les cellules racinaires en condition de carence en bore.	53
Figure 25 : Les acides boroniques provoquent le détachement de la membrane plasmique avec la paroi dans des cultures cellulaires de tabac.	55
Figure 26 : Modèle de sécrétion et d'assemblage des principaux composants de la paroi du tube pollinique.	62
Figure 27 : Organisation tissulaire de la racine d' <i>Arabidopsis</i>	64
Figure 28 : Critères régissant une réaction de « click Chemistry ».	66
Figure 29 : Mécanisme de la cycloaddition de Huisgen entre un alcyne et un azote.	66
Figure 30 : Structures de cyclooctynes utilisées en « click chemistry ».	68
Figure 31 : Modèle illustrant l'incorporation du Fuc-AI dans les cellules végétales.	69
Figure 32 : Structure putative de l'état de transition adopté par le substrat des FucTs de mammifère.	71
Figure 33 : Les sucres fluorés agissent en tant qu'inhibiteurs des glycosyltransférases.	72

Figure 34 : Sélection des mutants *qrtxsia2-2+/-* complémentés avec la construction PPE50::U19220. 93

Figure 35 : Effet du 2F-Fuc sur la croissance du tube pollinique d'*Arabidopsis*..... 178

Figure 36 : Conditions utilisées pour la PCR..... 188

Figure 37 : Conditions utilisées pour la RT-qPCR.. 191

Figure 38 : Technique de clonage USER..... 192

Figure 39 : Séquence de la région ADN-T du plasmide pBI101.3 utilisé pour la complémentation pollen-spécifique des mutants *qrt1xsia2-2+/-*..... 193

Figure 40 : Schéma représentant les différentes étapes de création des boucles recouvertes de Formvar® 200

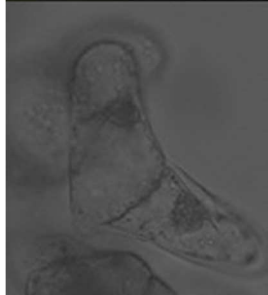
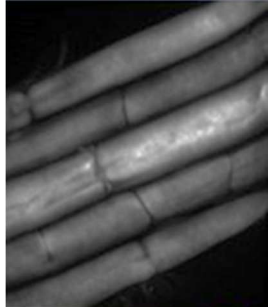
Figure 41 : Rôle structural du bore dans la paroi cellulaire et modèle hypothétique du bore en tant que molécule signal dans les cellules racinaires. 217

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Liste des protéines connues impliquées dans la synthèse du xyloglucane. ... 31

Tableau 2 : Liste des gènes impliqués dans la biosynthèse des pectines chez *Arabidopsis* dont l'activité transférase a été prouvée. 34

Tableau 3 : Analyse de l'efficacité de la complémentation sur le taux de germination du pollen..... 94



I-INTRODUCTION

I. La paroi primaire végétale : composition et biosynthèse

Nous considérerons la classe des Angiospermes, appelée communément « plantes à fleurs » qui regroupent environ 300 000 espèces végétales allant de l'eucalyptus géant d'Australie jusqu'aux lentilles d'eau. Les Angiospermes sont divisées en Magnoliidées, Monocotylédones et Eudicotylédones, selon la dernière classification de l'Angiosperm Phylogeny Group III reposant sur l'analyse de séquences de gènes (APG III, 2009). L'étude qui suit concernera plus particulièrement le clade des Eudicotylédones et plus particulièrement la famille des Brassicacées dont *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*) fait partie.

Chez les cellules jeunes, seule la paroi primaire est formée. Elle se compose à 90% de polysaccharides et 10% de protéines (**Fig. 1**) auxquels s'ajoutent des composés phénoliques et des minéraux. Mais cette composition reste néanmoins variable et peut être modulée en réponse aux besoins physiologiques de la cellule (attaque par des pathogènes, stress abiotiques, élongation cellulaire...). Les polysaccharides pariétaux sont divisés en trois familles : la cellulose, les hémicelluloses et les pectines formant un réseau dense avec divers niveaux d'organisation.

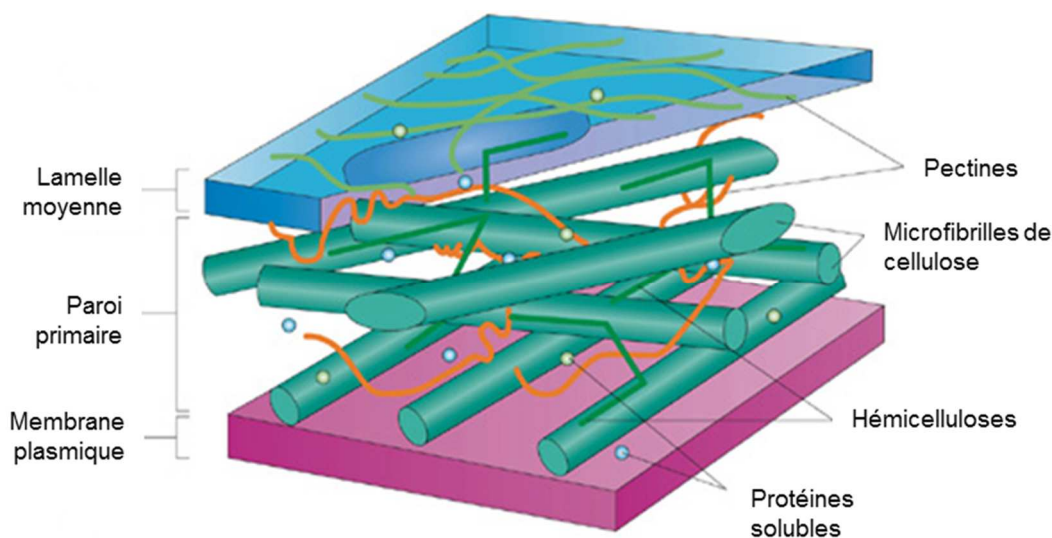


Figure 1 : La paroi primaire des Eudicotylédones. D'après Sticklen, 2008.

Chez les cellules plus âgées qui ne subissent plus ni division ni expansion, une seconde paroi plus épaisse peut-être formée contre la paroi primaire. Sa composition riche en cellulose,

hémicellulose et en lignine, un polymère de monolignols, la rend plus rigide que la paroi primaire et ne permet plus la croissance cellulaire (Zhong & Ye, 2015).

Cette première partie introductive du manuscrit sera consacrée exclusivement à la description de la paroi primaire.

1. Les polysaccharides pariétaux

a. Les β -glucanes : structure et synthèse

- La cellulose

Constituant 30 à 40% en masse de la paroi brute (McNeil *et al.*, 1984), la cellulose est le polymère le plus abondant sur la planète. Il est constitué de monomères de glucose (Glc) liés en β -(1 \rightarrow 4). Deux résidus inversés de glucose forment une molécule de cellobiose et ce dimère répété n fois forme la cellulose (n=250 à 7000). Plusieurs chaînes de cellulose sont associées entre elles grâce à des liaisons faibles (de type hydrogène ou de Van der Waals) inter- et intrachaînes et cristallisent en microfibrilles (Harris *et al.*, 2010). La cellulose est synthétisée au niveau de la membrane plasmique par un complexe de cellulose synthases (CESA), codées par une famille multigénique comportant 10 gènes (CESA1 à CESA10) chez *Arabidopsis* ayant des profils d'expression différents (Richmond & Somerville, 2000).

Mueller et Brown Jr ont mis en évidence dans les années 1980 que les CESA s'associaient en hexamères impliquant 3 différentes CESAs. Etant donné qu'une microfibrille est formée par cristallisation de 36 chaînes de cellulose, il a été proposé que les complexes de 6 CESAs soient, eux-mêmes, regroupés par 6 (Cosgrove, 2005 ; Mutwil *et al.*, 2008), l'ensemble formant une structure appelée rosette (**Fig. 2**).

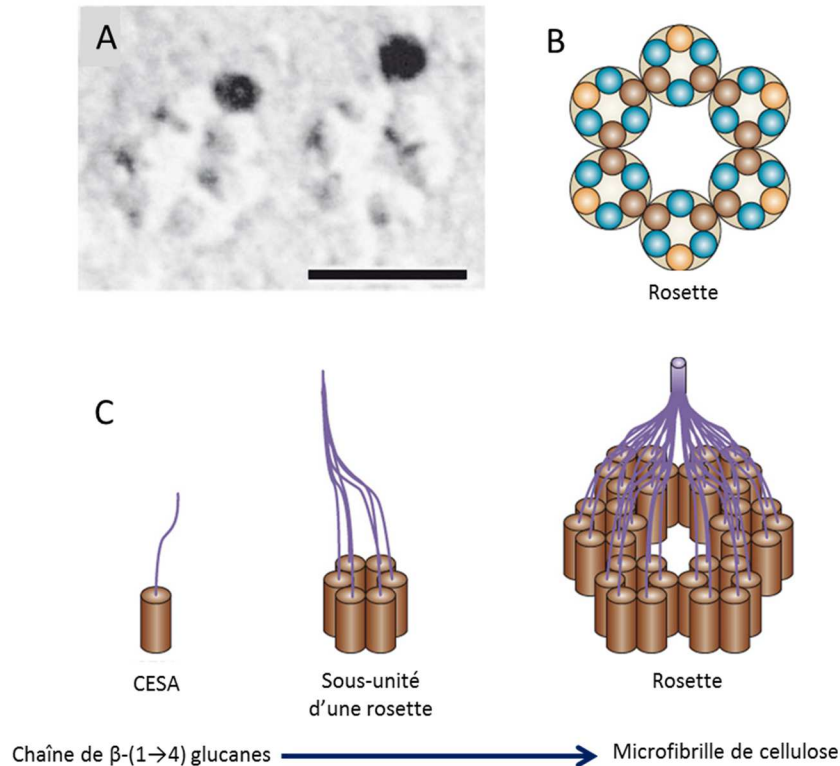


Figure 2 : Modèle de synthèse de la cellulose. *A.* Marquage par immuno-gold des enzymes CESAs organisées en rosette dans la membrane plasmique. *B.* Organisation d'une rosette regroupant 6 sous-unités constituées de 3 CESA différentes (α : orange; β : marron; γ : verte), formant le complexe de synthèse de la cellulose. *C.* Modélisation de la synthèse d'une microfibrille de cellulose. Sur ce modèle, chaque protéine CESA synthétise une chaîne de β -(1→4)-glucanes. En conséquence, chaque rosette synthétise 36 chaînes de glucanes formant une microfibrille de cellulose. D'après Cosgrove *et al.*, 2005.

Les microfibrilles de cellulose, avec une tension de résistance comparable à celle de l'acier, confère à la paroi sa résistance mécanique (Festucci-Buselli *et al.*, 2007), en particulier contre la pression de turgescence. L'orientation des microfibrilles de cellulose contrôlerait également le sens de l'élongation cellulaire (Green, 1962 ; Sugimoto *et al.*, 2001) Cette organisation peut être mise en évidence par marquage à l'aide de sondes fluorescentes telles que le calcofluor blanc qui se lie non spécifiquement aux β -glucanes (Hughes & McCully, 1975) ou au Pontamine FastScarlet 4B (S4B) (Hoch *et al.*, 2005 ; Anderson *et al.*, 2010).

- La callose

La callose est un polymère linéaire de glucoses liés majoritairement en β -(1→3) mais présentant également des liaisons en β -(1→6) (Chen & Kim, 2009). La callose est aussi synthétisée au niveau de la membrane plasmique par une famille d'enzymes, les callose synthases, codées par 12 gènes différents chez *Arabidopsis* (Richmond & Somerville, 2000 ; Verma & Hong, 2001). La callose est impliquée dans différents stades de croissance de la plante, en commençant par la mise en place de la plaque cellulaire au moment de la division. Elle formerait un manteau recouvrant la membrane plasmique et précéderait la déposition de cellulose pour la formation d'une nouvelle paroi (Samuels *et al.*, 1995). Une autre fonction connue de la callose est celui de renforcement pariétal. En effet, des accumulations de callose sont observées dans la paroi lors de premiers stades d'infection de plantes, assurant une barrière physique plus robuste contre la pénétration du pathogène (Luna *et al.*, 2011). Il est notamment admis depuis plusieurs années, que des dépôts de callose sont produits localement au niveau des plasmodesmes des éléments conducteurs de la sève élaborée suite à des stress biotiques ou abiotiques (Koh *et al.*, 2012 ; Jacobs *et al.*, 2003 ; Engleman & Esau, 1964). Ces dépôts peuvent être mis en évidence après traitement au bleu d'aniline (Jensen, 1962) ou par marquage au calcofluor blanc (Hughes & McCully, 1975). Le rôle majeur de la callose dans le développement du tube pollinique sera abordé plus loin dans le chapitre III de cette introduction.

b. Les hémicelluloses

Les hémicelluloses forment un groupe de polysaccharides ramifiés hétérogènes constitués d'un squelette de résidus liés en β -(1→4) pour ce qui concerne les XyGs, les xylanes, les mannanes et les glucomannanes, ou plus rarement en β -(1→3,1→4) (Scheller & Ulvskov, 2010). La composition des hémicelluloses, pour une espèce considérée, peut varier en fonction du tissu étudié. Néanmoins, le type d'hémicelluloses le plus rencontré dans la paroi primaire des Eudicotylédones (20 à 30%) est le XyG. Il comporte un squelette de β -(1→4)-glucose pouvant être ramifié en 6 par diverses courtes chaînes composées de xylose (Xyl), de galactose (Gal), de fucose (Fuc) ou encore d'arabinose (Ara) (**Fig. 3**). Certains oses peuvent aussi être O-acétylés.

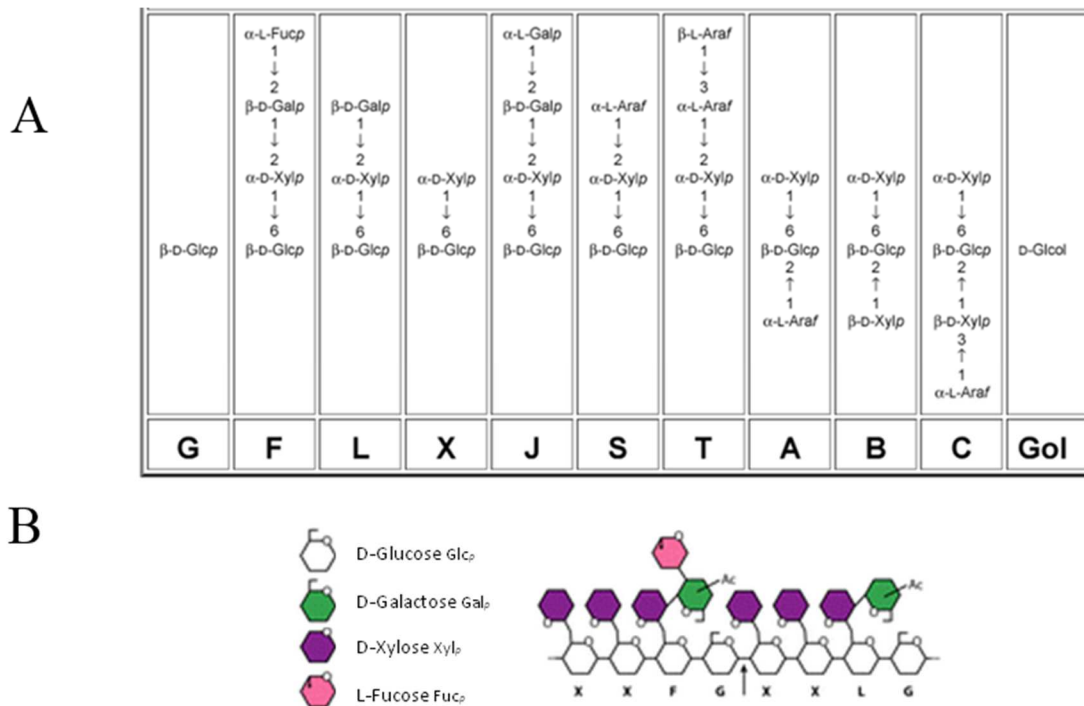


Figure 3 : Structure du xyloglucane. **A.** Code à une lettre attribué à chaque ramification du XyG selon la nomenclature de Fry *et al.*, (1993). Les résidus de Glc réducteurs convertis en alditol sont désignés par le code « Gol ». **B.** Structure d'une séquence de xyloglucane retrouvée chez *Arabidopsis*. D'après Scheller & Ulvskov, 2010.

Le XyG jouerait un rôle structural essentiel dans la paroi primaire. Cependant l'étude du double mutant *xxt1/xxt2* (*xylosyltransferase1/xylosyltransferase2*) (Cavalier *et al.*, 2008) affecté dans la synthèse du XyG révèle un phénotype peu marqué (plante légèrement plus petite avec des poils absorbants anormaux) en comparaison à une plante sauvage. Park et Cosgrove (2012b) ont analysé plus en détail la paroi du double mutant, montrant une paroi beaucoup plus extensible et ont conclu à un rôle du XyG, d'une part, dans le renforcement pariétal et d'autre part, dans le relâchement et l'extension pariétal *via* les α -expansines.

c. Les pectines

Les pectines forment une famille de polysaccharides riches en acide galacturonique (GalA), constituant 35% de la paroi primaire des Eudicotylédones. On distingue principalement trois grandes classes de pectines : les homogalacturonanes (HG), le rhamnogalacturonane de type I (RG-I) et le RG-II. Chez certaines espèces végétales, on retrouve d'autres classes de pectines telles que le xylogalacturonane (XGA) (**Fig. 4**). Très présentes au niveau de la lamelle moyenne, interface entre deux cellules adjacentes, les pectines jouent un rôle dans l'adhésion

des cellules entre elles (Bouton *et al.*, 2002 ; MacDougall *et al.*, 1996). De nombreuses autres fonctions sont attribuées aux pectines notamment dans la morphogenèse, la croissance de la plante, la structure de la paroi, l'expansion cellulaire, la croissance du tube pollinique ou encore dans la signalisation cellulaire et la défense de l'organisme (Mohnen, 2008 ; Atmodjo *et al.*, 2013). La présence des pectines peut être mise en évidence par marquage au rouge de ruthénium (Hou *et al.*, 1999) mais aussi et c'est également le cas pour les hémicelluloses, par immunomarquage grâce aux nombreux anticorps monoclonaux actuellement disponibles.

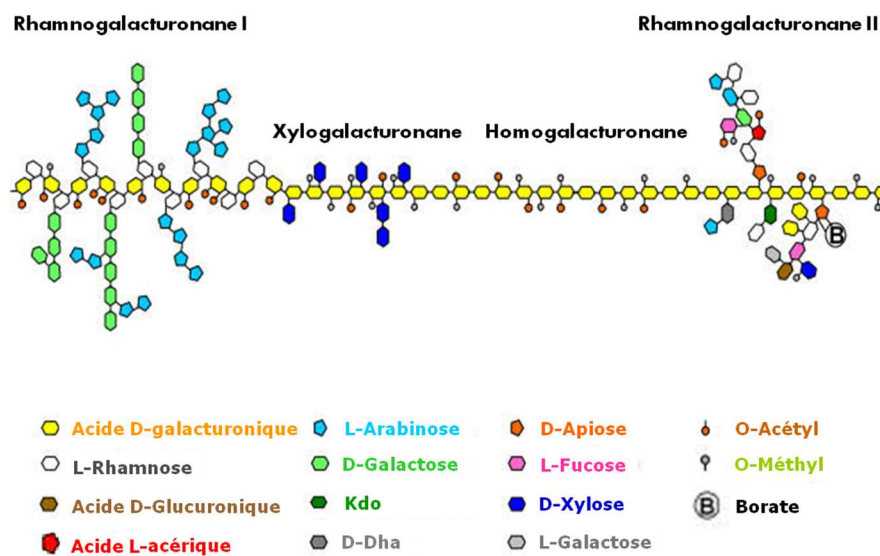


Figure 4 : Représentation schématique des principales pectines de la paroi primaire des Eudicotylédones. D'après Harholt *et al.*, 2010.

- Les Homogalacturonanes (HG)

Les HGs sont des homopolymères linéaires formés d'environ 100 résidus de GalA liés en α -(1→4). Les HGs sont partiellement méthylestérifiés sur la fonction carboxylique en C₆ et peuvent être O-acétylés en 2 ou en 3 (Mohnen, 2008 ; Caffall & Mohnen, 2009). La distribution et les degrés de méthylestérification (DM)/acétylation varient en fonction du stade de développement de la plante et du tissu considéré. Plus particulièrement, le DM peut avoir des conséquences sur les propriétés mécaniques de la paroi et ainsi réguler la croissance cellulaire et la forme des cellules. Les HGs seraient déposés au niveau de la paroi primaire sous forme fortement méthylestérifiés puis seraient dé-méthylestérifiés par des pectines méthylestérases (PMEs), facilitant l'action d'autres enzymes agissant dans le relâchement pariétal. Les résidus GalA non méthylés en C₆ sont alors chargés négativement et peuvent interagir avec les ions

calciques (Ca^{2+}) pour former un gel, renforçant la paroi cellulaire. La structure *in vivo* du complexe HG-calcium est souvent modélisée en « boîte à œufs » (Liners *et al.*, 1989) (**Fig. 5**).

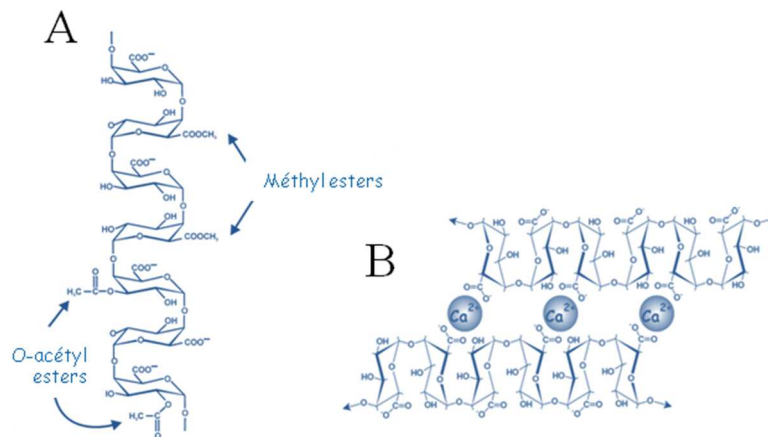


Figure 5 : Structure et organisation des homogalacturonanes. A. Structure d'une molécule d'HG indiquant les sites de méthylestérification en C₆ et d'O-acétylation en position 2 ou 3. B. Modèle en « boîte à œufs ». Interaction de deux ou plusieurs chaînes d'HG grâce à la formation de ponts calciques entre les fonctions carboxyliques. D'après Caffall & Mohnen, 2009 ; Vincken *et al.*, 2003.

Les HGs peuvent aussi être substitués par un ou plusieurs résidus Xyl liés en β -(1→3) aux GalA du squelette formant ainsi le XGA, retrouvé dans la paroi de plusieurs tissus chez *Arabidopsis* (Zandleven *et al.*, 2007).

L'étude de la dynamique spatio-temporelle des HG peut être réalisée traditionnellement par immunocytochimie mais également grâce à l'utilisation de nouvelles sondes spécifiques développées par Mravec *et al.* (2014). La technique consiste à utiliser des oligomères de chitosane, couplés soit à un fluorochrome soit à des particules d'or, pour une observation en microscopie photonique ou électronique respectivement, qui se lie par interactions ioniques aux HGs déméthylestérifiés. Les auteurs ont pu ainsi suivre le processus de déméthylestérification des HGs au cours du développement de la coiffe racinaire d'*Arabidopsis*.

- Le rhamnogalacturonane de type I (RG-I)

Le RG-I, autre polysaccharide membre de la famille des pectines, est constitué d'un squelette de n unités disaccharidiques répétées de α -(1→4)-GalA- α -(1→2)-rhamnopyranose où n peut être supérieur à 100. Les résidus GalA peuvent porter des groupements O-acétyls positionnés en 2 et 3. De 20 à 80% des résidus rhamnose (Rha) portent en C₄ des chaînes

latérales neutres d'oligo- ou de polysaccharides de β -(1→4)-galactanes, des chaînes hétérogènes d'arabinogalactanes de type I (AG-I) et de type II (AG-II) et/ou des chaînes d' α -(1→5)-arabinanes (Lerouge *et al.*, 1993 ; Ridley *et al.*, 2001, Caffal & Mohnen, 2009) (**Fig. 6**). Les AG-I sont composés d'une partie linéaire de β -(1→4)-galactanes liés en α -(1→3) à des chaînes d' α -(1→5)-arabinanes. Les AG-II, plus souvent retrouvés associés aux arabinogalactanes protéines (AGPs), se caractérisent par un squelette de β -(1→3)-galactanes substitués en C₆ par un à trois résidus Gal, eux-mêmes « coiffés » par des résidus d'Ara terminaux.

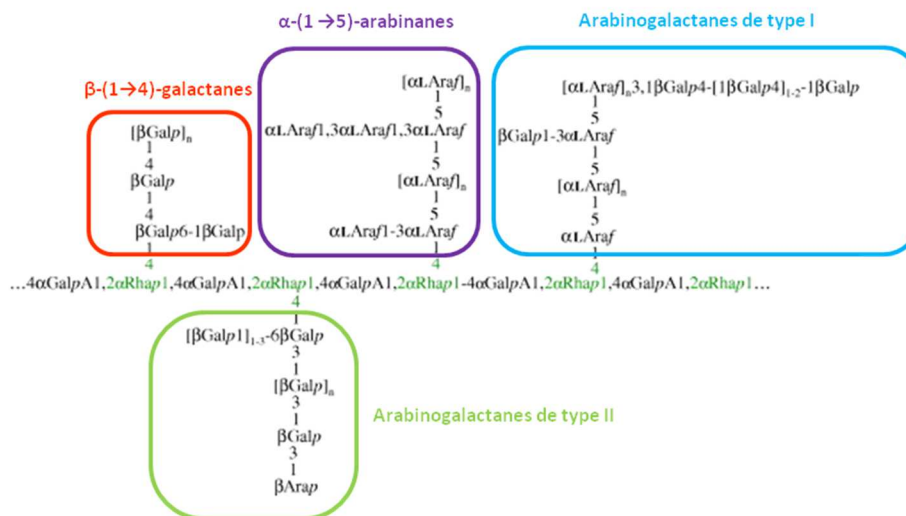


Figure 6 : Structure du squelette et des différentes chaînes latérales du RG-I. D'après Caffal & Mohnen, 2009.

- Le rhamnogalacturonane de type II (RG-II)

Contrairement au RG-I, le RG-II est un polysaccharide pectique de faible poids moléculaire (5-10 kDa) qui possède une structure reconnue comme étant la plus complexe retrouvée au sein de la paroi mais qui est peu variable. Le RG-II isolé des autres pectines par traitement enzymatique à l'endo- α -(1→4)-polygalacturonase (EPG) ne représente que 3 à 8% de la fraction pectique de la paroi primaire des Eudicotylédones (O'Neill *et al.*, 2004; Yapo, 2011). Une description plus exhaustive de cette pectine particulière fera l'objet du chapitre II.

2. Les protéines pariétales

Faiblement représentées quantitativement au sein de la composition de la paroi, les glycoprotéines n'en sont pas moins indispensables à l'intégrité pariétale. On distingue les protéines structurales des protéines à rôle enzymatique qui participent à la structuration de la paroi, son remodelage et à la défense de la plante contre les pathogènes. Les protéines structurales sont classées en fonction de leur séquence en acides aminés et leurs profils de glycosylation. En effet, on distingue particulièrement les glycoprotéines riches en hydroxyproline (HRGP) et les protéines riches en glycine (GRP). La proportion de ces protéines fortement glycosylées varie selon le type cellulaire considéré et l'état physiologique des cellules.

a. Les protéines structurales

- Les glycoprotéines riches en hydroxyproline (HRGP)

Après synthèse du squelette peptidique, les HRGPs subissent des modifications post-transcriptionnelles dans le réticulum endoplasmique (ER) par les enzymes prolyl 4-hydroxylases, formant des résidus 4-hydroxyproline (4-Hyp), sites de *O*-glycosylation des protéines (Lamport, 1965 ; Estevez *et al.*, 2006). Ces sites porteront de courtes chaînes d'arabino-oligosaccharides ou de plus longues chaînes d'arabinogalactanes. Les HRGPs, fortement glycosylées, sont impliquées dans l'ensemble des aspects de la croissance et du développement de la plante depuis l'embryogenèse (Xu *et al.*, 2011) jusqu'au développement du tube pollinique (Mollet *et al.*, 2002). Néanmoins, l'hétérogénéité de la partie glycanique rend difficile l'extraction et la purification d'une HRGP afin de lui attribuer une fonction précise (Sommer-Knudsen *et al.*, 1998). De plus, la partie glycanique masque la partie protéique, ainsi il est souvent admis que c'est la partie glycosylée qui détermine la fonction. Parmi les HRGPs, on distingue les AGPs, les extensines et les protéines riches en proline (PRPs).

Les extensines, protéines pariétales modérément glycosylées, sont les plus étudiées. Elles se caractérisent par la répétition du motif sérine (hydroxyproline)₄ [Ser(Hyp)₄]. Elles sont riches en Ser, proline (Pro), Hyp, valine (Val), histidine (His), lysine (Lys) et tyrosine (Tyr). La plupart des résidus Hyp sont substitués par 1 à 4 résidus Ara et quelques Ser peuvent être glycosylées avec un Gal (Showalter, 1993). Des liaisons diphenyléther intramoléculaires et intermoléculaires peuvent se former entre deux résidus proches de Tyr (Kieliszewski & Lamport, 1994 ; Brady *et al.*, 1996 ; Held *et al.*, 2004) formant une liaison isodityrosine (**Fig. 7**). Ces HRGPs seraient particulièrement impliquées dans la défense contre les stress biotiques

(Esquerre-Tugaye & Mazau 1974 ; Xie *et al.*, 2011 ; Plancot *et al.*, 2013 ; Nguema-Ona E *et al.*, 2014) et joueraient un rôle essentiel dans l'embryogenèse et la mise en place de la plaque cellulaire (Hall & Cannon, 2002).

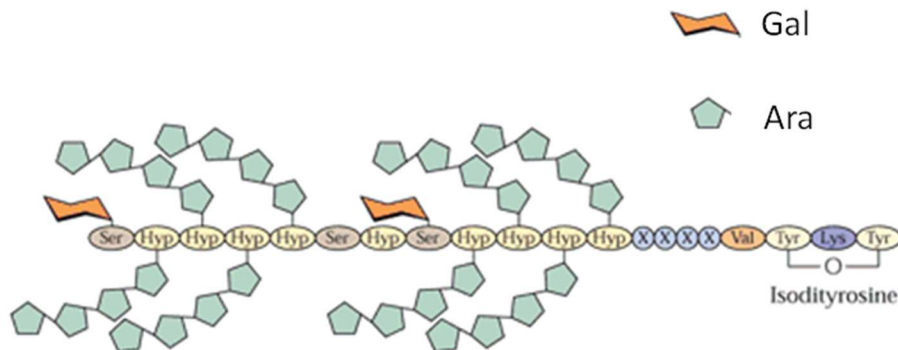


Figure 7 : Représentation schématique d'une extensine de tomate arborant une liaison intramoléculaire isodityrosine. D'après Carpita & McCann, 2000.

Les extensines formeraient des liaisons ioniques avec les pectines grâce aux résidus Lys et His chargés positivement et les charges négatives des acides uroniques pectiques (Showalter, 1993).

Les AGPs sont des HRGPs fortement glycosylées, puisque la partie glycanique constitue en moyenne 90% en masse de la molécule. La glycosylation des AGPs est très hétérogène, elle varie selon l'espèce, l'organe et le type cellulaire considérés mais est principalement formée de chaînes d'AG-II ainsi que minoritairement de résidus Fuc, Xyl, Rha et d'acide glucuronique (GlcA) (Seifert & Roberts, 2007 ; Nguema-Ona *et al.*, 2012). Les AGPs sont *O*-glycosylées principalement sur les résidus Hyp et plus rarement sur des résidus Ser et Thr. Initialement divisées en deux classes : AGPs dites « classiques » et AGPs « non classiques », la dernière classification distingue quatre types d'AGPs avec des domaines peptidiques spécifiques. Certaines possèdent une ancre lipidique glycosylphosphatidylinositol (GPI) en C-terminal (Ellis *et al.*, 2010) permettant leur liaison à la membrane plasmique (**Fig. 8**). Leur rôle biologique a été démontré dans de nombreux stades de développement de la plante notamment l'embryogenèse somatique (Van Hengel *et al.*, 2002) ; la croissance du tube pollinique (Mollet *et al.*, 2002) ; la croissance racinaire (Nguema-Ona *et al.*, 2012) ou encore l'interaction plante-microorganismes (Nguema-Ona *et al.*, 2013). La plupart de ces fonctions ont été élucidées indirectement grâce au réactif β -glucosyl-Yariv (Yariv) (Yariv *et al.*, 1967) qui interfère spécifiquement avec les chaînes de galactanes liés en β -(1 \rightarrow 3) des AGPs (Kitazawa *et al.*, 2013).

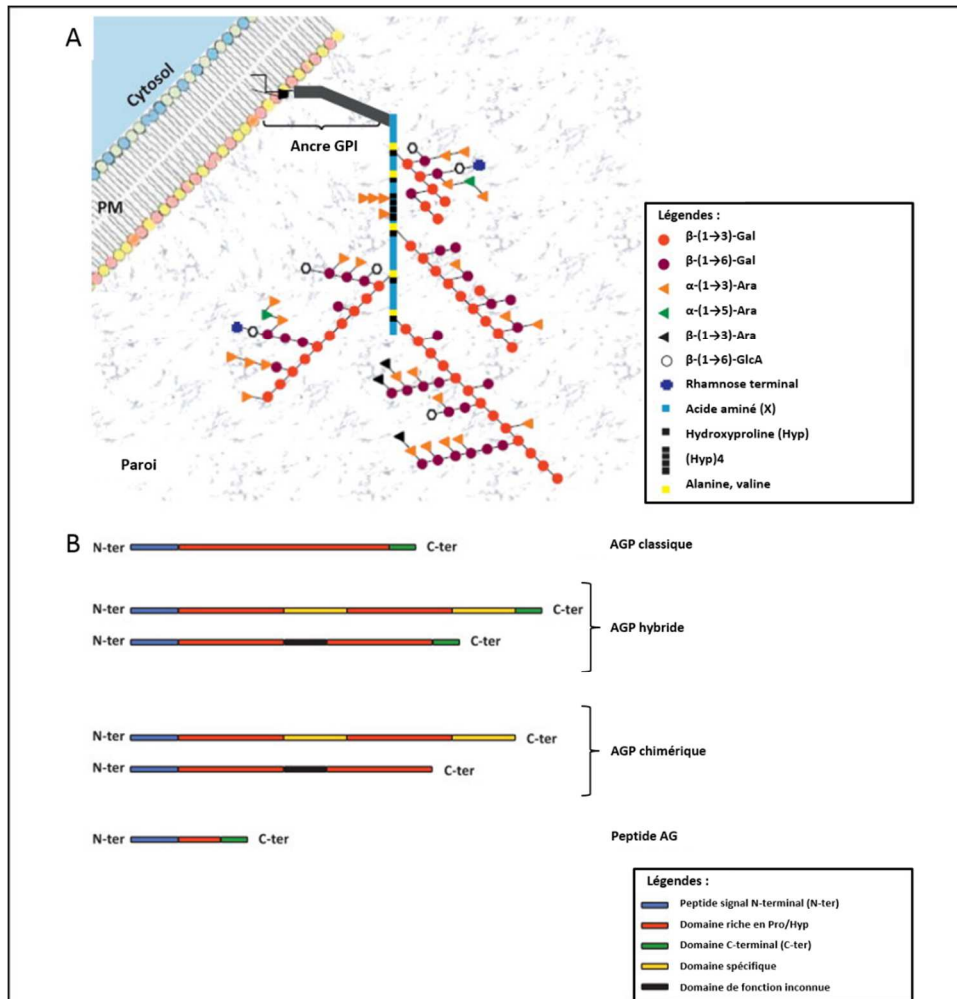


Figure 8 : Structure des arabinogalactane-protéines (AGPs). **A.** Les AGPs sont des protéines pariétales fortement glycosylées pouvant être ancrées à la membrane plasmique par une ancre GPI. La partie glycanique est très hétérogène. **B.** Classification des AGPs en AGP classique, AGP hybride, AGP chimérique, peptide AG (courte AGP classique). Les AGPs hybrides peuvent contenir des domaines spécifiques dans leur séquence. PM : membrane plasmique. D'après Nguema-Ona *et al.*, 2013.

Les PRPs contiennent essentiellement le motif Pro-Hyp-Val-Tyr-Lys répété n fois et sont faiblement glycosylées (Cassab, 1998) (**Fig. 9A**). Leur fonction spécifique n'a pas encore été déterminée bien que leur implication dans la différenciation du xylème (Loopstra & Sederoff, 1995) et la formation des nodules (Sherrier *et al.*, 2005) est fortement pressentie.



Figure 9 : Représentation schématique d'une protéine riche en proline (PRP) de soja (A) et d'une protéine riche en glycine (GRP) de pétunia (B). D'après Carpita & McCann, 2000.

- Les protéines riches en glycine (GRPs)

Cette famille de protéines pariétales se caractérise par la répétition de courtes séquences riches en glycine (**Fig. 9B**). Une classification basée sur leur structure générale, l'arrangement des domaines riches en glycine ainsi que la présence d'autres motifs conservés a permis de distinguer cinq grands types de GRPs. Le rôle de ces protéines dans la structuration de la paroi a été proposé depuis la purification des premières GRPs (Condit & Meagher, 1987) mais les données recueillies jusqu'à présent ne permettent pas d'être plus précis. Cependant, l'étude de leurs motifs protéiques, leurs localisations cellulaires mais aussi la régulation de l'expression des gènes impliqués dans leurs synthèses a permis d'attribuer aux GRPs un rôle dans la défense de la plante, l'hydratation du pollen ou encore la résistance au stress osmotique (Sachetto-Martins *et al.*, 2000 ; Mangeon *et al.*, 2010).

b. Les enzymes de la paroi primaire.

La morphogenèse et l'expansion cellulaire nécessitent un remodelage contrôlé de la paroi et, en particulier, de ces polysaccharides constitutifs. Ce procédé délicat qui implique un relâchement pariétal tout en conservant l'intégrité mécanique de la paroi face à une forte pression de turgescence est assuré par diverses enzymes présentes au sein même de la paroi primaire.

- Remodelage des homogalacturonanes

Les polygalacturonases (PGs), de type endo-PGs (EC 3.2.1.15) ou exo-PGs (EC 3.2.1.67), sont impliquées dans le remodelage pariétal *via* leur action d'hydrolyse du squelette HG. Soixante-neuf gènes codant des PGs putatives ont été identifiés dans le génome d'*Arabidopsis*. Elles interviennent principalement au cours des phénomènes de séparation cellulaire qui ont

lieu lors d'abscission d'organes tels que les fleurs et les feuilles mais aussi lors des processus d'expansion cellulaire (González-Carranza *et al.*, 2002, 2007 ; Xiao *et al.*, 2014).

Les pectates lyases-like (PLLs) clivent les liaisons α -(1→4) du squelette HG par réaction de β -élimination. Là encore, on distingue les endo-pectates lyases (EC 4.2.2.2), les exo-pectates lyases (EC. 4.2.2.9) et les pectines lyases (EC 4.2.2.10). Les pectates lyases diffèrent des pectines lyases par leur besoin en ions Ca^{2+} pour leur activité catalytique (Benen & Visser, 2003). Ces enzymes sont également sécrétées par de nombreux organismes pathogènes (Payasi *et al.*, 2008).

Les groupements *O*-acétyl retrouvés en 2 ou en 3 sur les HGs (jusqu'à 10% d'acétylation) peuvent être hydrolysés par les enzymes appelées pectines acétyl estérases (PAEs; EC 3.1.1.6). Leurs rôles physiologiques émergent peu à peu, impliquant les PAEs dans la plasticité pariétale et la résistance aux pathogènes (de Souza *et al.*, 2014).

Les PME (EC 3.1.1.11) appartiennent à une large famille multigénique (66 gènes chez *Arabidopsis*) et peuvent être exprimées de façon organe- ou stress-spécifique (Pelloux *et al.*, 2007). Elles catalysent la dé-méthylestérification des HGs au sein de la paroi, créant des groupements carboxyles chargés négativement. Les HGs dé-méthylestérifiés peuvent ainsi, d'une part, établir des ponts calciques favorisant l'arrangement des HGs en « boîtes à œufs » et former un gel qui favorise la stabilité de la paroi. D'autre part, l'action des PME libère des protons qui, localement vont acidifier le pH de la paroi réduisant l'activité des PME elles-mêmes et favorisant l'action d'autres enzymes (endo-PGs, PLLs,...). Ainsi, les PME contribuent majoritairement au remodelage des pectines *in muro* et au relâchement pariétal. Leur activité est étroitement régulée par la présence d'inhibiteurs dénommés PMEIs (inhibiteurs de pectines méthylestérases) (**Fig. 10**) (Jolie *et al.*, 2010 ; Sénéchal *et al.*, 2014).

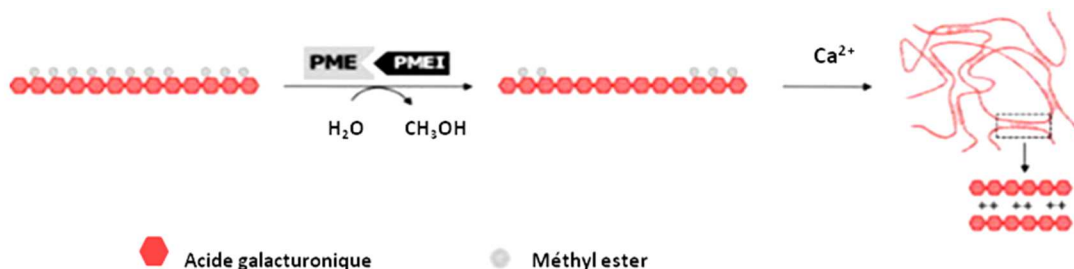


Figure 10 : Représentation schématique de l'action des PME et de leur inhibiteur PMEI dans la formation d'un gel pectique. D'après Jolie *et al.*, 2010 .

- Les xyloglucane endo-transglucosidases/hydrolases (XTH) et les *endo*- β -(1→4)-glucanases (EGases)

Les XyG endo-transglucosidases/hydrolases (XTHs) ont pour substrat le XyG. Elles participent au remodelage pariétal en participant à l'assemblage/démantèlement du réseau cellulose/XyG de la paroi primaire (**Fig. 11**). Elles appartiennent à la famille 16 des hydrolases et ont une activité enzymatique de xyloglucane : endo-transglucosidase (activité de xyloglucosyltransférase) et/ou de xyloglucane : endo-hydrolase (activité d'endo- β -1,4-glucanase) (Thompson & Fry, 2001 ; Rose *et al.*, 2002). Chez *Arabidopsis*, 33 gènes ont été identifiés avec des profils d'expression variables permettant une action temporellement et spatialement régulée. Des stress mécaniques, des conditions d'hypoxie ou d'anoxie vont entraîner une surexpression des gènes codant les XTH (Nishitani & Vissenberg, 2007).

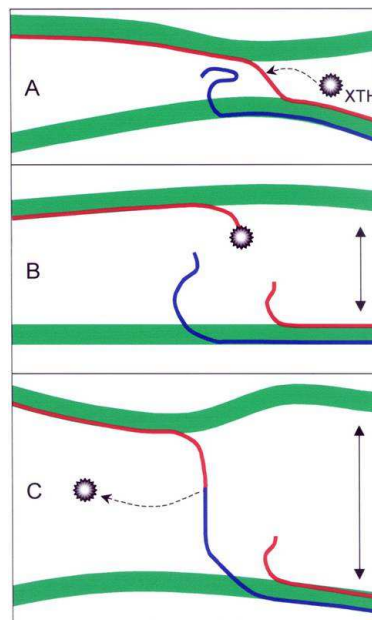


Figure 11 : Mode d'action des XTHs. Les XTHs clivent une chaîne de XyG (représentée en rouge) qui permet la liaison entre deux microfibrilles de cellulose voisines (représentées en vert), par des liaisons hydrogènes. Sous la pression de turgescence, les microfibrilles se retrouvent éloignées du complexe XTH-XyG formé (comme indiqué par les doubles flèches). Une autre chaîne de XyG adjacente vient se fixer sur le site catalytique de l'enzyme formant un XyG hybride et recréant une liaison entre les deux microfibrilles de cellulose. D'après Rose *et al.*, 2002.

Les endo- β -(1→4)-glucanases (EGases) hydrolysent les liaisons β -(1→4)-glucosyl des β -(1→4)-glucanes non substitués. Elles sont codées par une famille de 25 gènes chez *Arabidopsis*. Dans la paroi primaire, leurs principales cibles sont la cellulose et les XyGs. Elles agissent dans les régions où la cellulose n'est pas cristalline et relarguent les XyGs attachés aux microfibrilles

de cellulose entraînant un relâchement pariétal (Wieczorek *et al.*, 2008). De nombreux organismes pathogènes sécrètent ces enzymes favorisant l'infection de la plante. D'autres évidences suggèrent que certaines EGases associées à la membrane interviendraient dans la biosynthèse de la paroi (Levy *et al.*, 2002).

- Des protéines non enzymatiques : les expansines

Les expansines ont été identifiées pour la première fois dans le phénomène d'élongation cellulaire par croissance « acide » (McQueen-Mason *et al.*, 1992) faisant référence à une stimulation rapide de la croissance en réponse à un pH de la paroi plus acide. Les expansines ont une action unique sur le relâchement pariétal de manière pH-dépendant. Deux familles d'expansines ont été différenciées chez les Angiospermes, les α -expansines et les β -expansines qui ont une structure proche mais différent de par leur affinité de substrat, la deuxième famille serait plus spécifique des Poacées, et de par leur profil de *N*-glycosylation (Cosgrove *et al.*, 2002). Chez *Arabidopsis*, 26 gènes codent pour des α -expansines et 5 pour des β -expansines. (http://www.personal.psu.edu/fsl/ExpCentral/about_expansins.htm). Leurs séquences protéiques sont constituées de trois parties : un domaine *N*-terminal contenant un peptide signal d'adressage au système de sécrétion, un domaine catalytique central homologue à celui des enzymes de la famille des endo-glucanases et un domaine similaire à un domaine de liaison à la cellulose. Malgré la forte similarité de séquence avec d'autres enzymes pariétales, aucune activité enzymatique n'a pu être détectée dans les préparations d'expansines. Ainsi, jusqu'à présent, l'activité attribuée aux expansines sur l'expansion de la paroi n'est pas reconnue en tant qu'activité hydrolytique (Cosgrove 2000a, 2000b). Les expansines perturberaient les liaisons covalentes établies entre la cellulose et les hémicelluloses induisant une dissociation et un déplacement des hémicelluloses qui reformeront une liaison avec une autre microfibrille de cellulose (**Fig. 12**).

Les expansines permettent un relâchement pariétal rapide en réponse à un stress et joue un rôle important dans la maturation des fruits (Rose & Bennett, 1999).

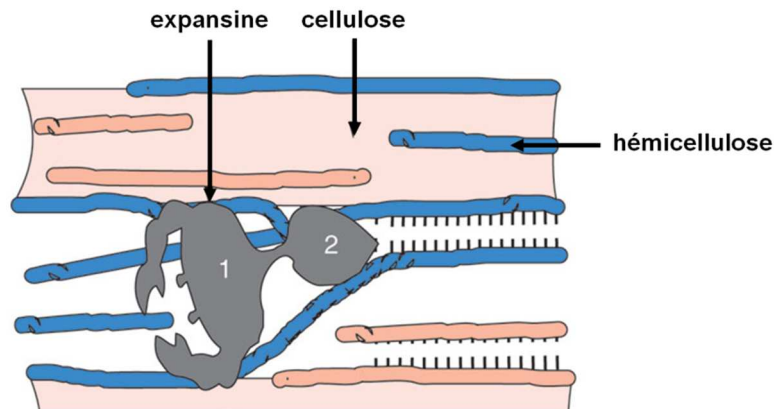


Figure 12 : Le relâchement pariétal par les expansines. Les α -expansines induisent, au niveau de leur site catalytique (1), une dissociation locale et un glissement des hémicelluloses à la surface des microfibrilles de cellulose. Ces enzymes possèdent un domaine de liaison (2) qui permet leur ancrage à la surface de la cellulose. Les β -expansines, ont un mode d'action similaire mais agiraient sur d'autres glycanes, tels que les xylanes. D'après Sampedro & Cosgrove, 2005.

3. Biosynthèse golgienne des hémicelluloses et des pectines

a. Biosynthèse des précurseurs : les nucléotides-sucres

Les hémicelluloses et les pectines sont formés à partir de la polymérisation de nucléotides-sucres dits sucres « activés ». Leurs synthèses s'effectuent à partir de quelques nucléotides-sucres précurseurs : l'UDP-glucose (Uridine diphosphate-Glc) et le GDP-mannose (GDP-Man), eux-mêmes formés dans le cytosol à partir du fructose-6-phosphate, produit de la photosynthèse (Reiter, 2008). C'est grâce à l'action combinée d'enzymes d'interconversion comprenant des épimérasés, des décarboxylases, des déshydratases, des réductases et des mutases que les 30 nucléotides-sucres différents, identifiés chez les plantes, seront synthétisés (Reiter, 2008 ; Yin *et al.*, 2011). Parallèlement à cette voie principale de synthèse *de novo*, une deuxième voie, appelée « voie de recyclage » (« salvage pathway ») permet la conversion de sucres libres en nucléotides-sucres, par l'action de kinases et d'UDP-phosphorylase (**Fig. 13**) (Bar-Peled & O'Neill, 2011 ; Geserick & Tenhaken, 2013).

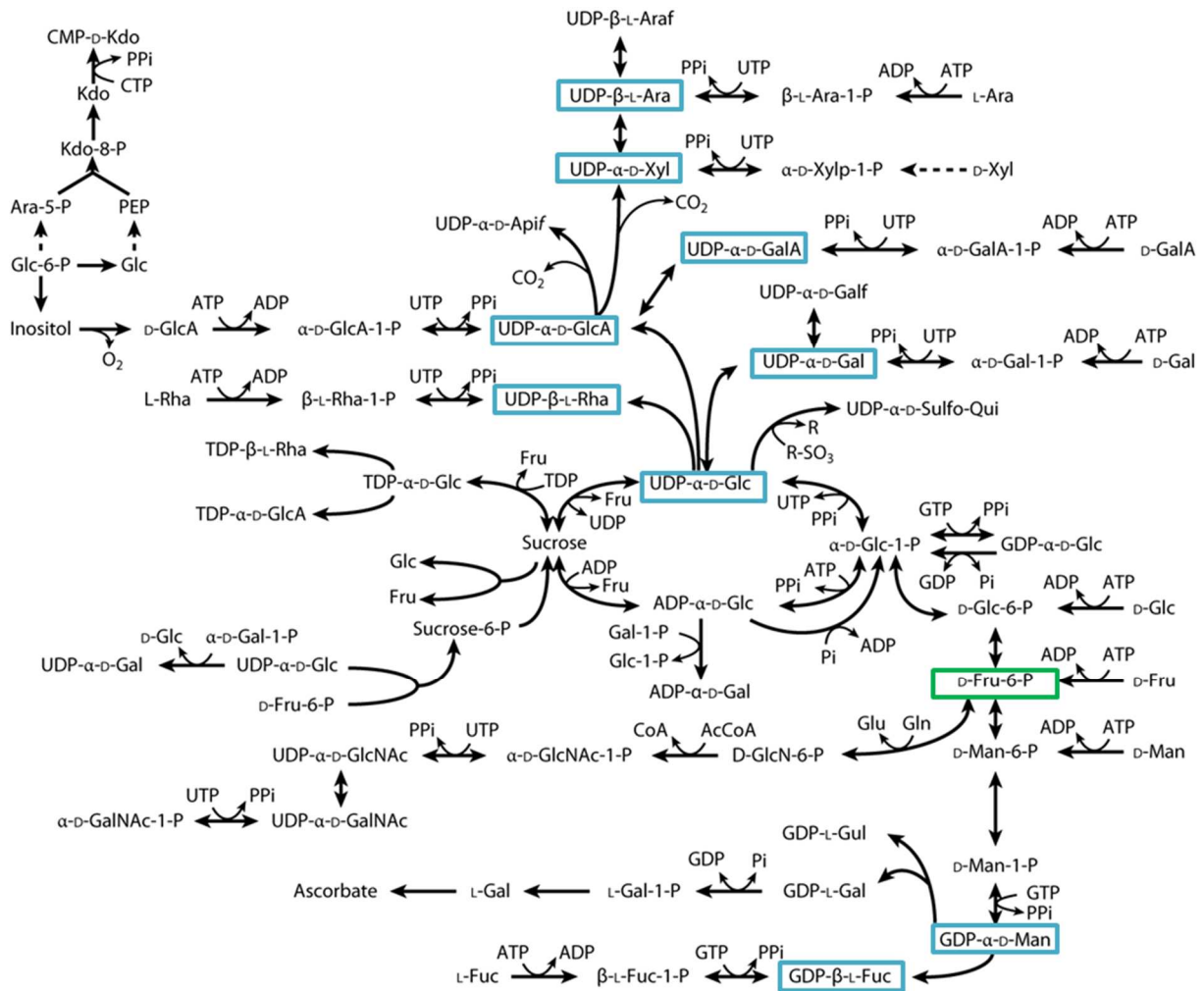


Figure 13 : Principales voies de synthèse et d'interconversion des nucléotides-sucres chez les plantes. Les principaux nucléotides-sucres nécessaires à la synthèse de la paroi sont encadrés en bleu. Ils dérivent du fructose-6-P (encadré en vert), produit lors de la photosynthèse, grâce à l'action de différentes enzymes impliquées dans les mécanismes d'interconversion. Les sucres libres peuvent également être engagés dans la synthèse de nucléotides-sucres *via* la « voie de recyclage ». D'après Bar-Peled & O'Neill, 2011.

Afin de contourner la différence de localisation entre les nucléotides-sucres produits majoritairement dans le cytosol, et les sites de synthèse des polysaccharides et des glycoprotéines, des transporteurs vont permettre leur acheminement vers la lumière de l'appareil de Golgi.

b. Le transport des nucléotides-sucres

Les analyses phylogénétiques prédisent l'existence d'une cinquantaine de transporteurs de nucléotides-sucres dans le génome d'*Arabidopsis* (Rautengarten *et al.*, 2014). Cependant, très

peu de mutants affectés dans la synthèse de ces protéines ont un phénotype visuellement différent d'une plante sauvage ce qui a ralenti leur identification et leur caractérisation fonctionnelle. Ainsi, seuls quelques transporteurs ont été caractérisés pour le transport de GDP-Man (Baldwin *et al.*, 2001 ; Handford *et al.*, 2004), UDP-Gal (Norambuena *et al.*, 2005 ; Rollwitz *et al.*, 2006), CMP-acide sialique (cytidine monophosphate-acide sialique, Takashima *et al.*, 2009) et plus récemment une famille de transporteurs d'UDP-Xyl a été identifiés (Ebert *et al.*, 2015). Certaines de ces protéines ne sont pas toujours spécifiques d'un seul substrat, comme la famille de transporteurs dits bi-fonctionnels d'UDP-Rha/UDP-Gal (Rautengarten *et al.*, 2014) ou encore d'UDP-Glc/UDP-Gal (Norambuena *et al.*, 2002 ; Handford *et al.*, 2012). Suite à leur transport, les nucléotides-sucres seront pris en charge par les enzymes de synthèse des polysaccharides pariétaux : les glycosyltransférases (GTs). Leur domaine catalytique est situé dans le lumen de l'appareil de Golgi et chaque GT est fortement spécifique d'un nucléotide-sucres et d'un type de liaison.

c. Biosynthèse golgienne du xyloglucane et des pectines

A la différence de la cellulose et de la callose, les hémicelluloses et les pectines sont synthétisées au niveau de l'appareil de Golgi (Driouich *et al.*, 2012). Leurs structures complexes nécessitent une certaine organisation des enzymes d'interconversion des nucléotides-sucres, une coordination avec leurs transporteurs et les GTs associées. La compartimentation de l'appareil de Golgi en fait un organite adapté à leurs biosynthèses et le développement des méthodes d'immunolocalisation couplées aux approches de microscopie électronique a permis de grand progrès concernant la compréhension de la biosynthèse de ces polysaccharides pariétaux (Follet-Gueye *et al.*, 2012). Les polysaccharides non cellulosiques seraient synthétisés et modifiés au cours de leur acheminement à travers les différents saccules golgiens et le réseau *trans*-golgien, puis transportés vers la paroi *via* des vésicules de sécrétion.

- Biosynthèse du xyloglucane

Le squelette glycanique du XyG serait synthétisé par un ou plusieurs gènes membres de la famille des cellulose synthases-like (CSLs) dont certaines ont été localisées dans l'appareil de Golgi (Davis *et al.*, 2010). Leurs fonctionnements seraient similaires à celui des protéines CESA, avec un transfert des nucléotides-sucres, l'UDP-glucose, sur la chaîne glucanique en cours de synthèse (Pauly *et al.*, 2013 ; Schultink *et al.*, 2014). Puis, les enzymes α -(1→6)-xylosyltransférases (XylTs), appartenant à la famille des GT34 (classement de la base de données CAZy : Carbohydrate-Active enZyme), transfèrent les résidus Xyl, à partir d'UDP-

xylose, sur l'avant-dernier résidu Glc d'un cellopentaose ou d'un cellohexaose (Faik *et al.*, 2002 ; Cavalier & Keegstra, 2006). Un résidu Gal peut substituer les chaînes de XyG, par l'action des β -(1→2)-galactosyltransférases [β -(1→2)-GalTs]. Chez *Arabidopsis*, deux de ces enzymes ont été identifiées : AtMUR3 (Madson *et al.*, 2003) et AtXLT2 (Jensen *et al.*, 2012), spécifique du transfert d'un Gal sur, respectivement, le 3^{ème} et le 2^{ème} résidu Xyl. Enfin, une seule enzyme α -(1→2)-fucosyltransférase (AtFUT1), appartenant à la famille des GT37, a été caractérisée comme étant responsable du transfert d'un résidu Fuc terminal sur un résidu Gal d'une chaîne de XyG (Perrin *et al.*, 1999 ; Vanzin *et al.*, 2002).

Une structure particulière a été retrouvée lors de l'analyse du XyG des poils absorbants d'*Arabidopsis* par Peña *et al.* (2012). En effet, un résidu GalA est dans ce cas ajouté au Xyl grâce à l'enzyme codée par AtXUT1, identifiée par une approche de génétique inverse. Cette découverte de deux chaînes acides sur le XyG ajoute deux lettres à la nomenclature de Fry (1993) : Y [β -D-GalpA-(1→2)- α -D-Xylp-(1→6)- β -D-Glcp] et Z [α -L-Fucp-(1→2)- β -D-GalpA-(1→2)- α -D-Xylp-(1→6)- β -D-Glcp].

Tableau 1 : Liste des protéines connues impliquées dans la synthèse du xyloglucane. FucT : Fucosyltransférase ; GalT : galactosyltransférase ; GalAT : galacturonosyltransférase ; GlcT : glucosyltransférase ; O-AcT : O-acétyltransférase ; XylT : xylosyltransférase .

Activité	Gène	Famille CAZY	Références
β -(1→4)GlcT	CSLC4	GT2	Cocuron <i>et al.</i> , 2007
α -(1→6)-XylpT	XXT1-5	GT34	Cavalier et Keegstra, 2006 ; Cavalier <i>et al.</i> , 2008 ; Faik <i>et al.</i> , 2002 ; Vuttipongchaikij <i>et al.</i> , 2012 ; Zabolina <i>et al.</i> , 2008
β -(1→2)GalpT	MUR3	GT47	Madson <i>et al.</i> , 2003
β -(1→2)GalpT	XLT2	GT47	Jensen <i>et al.</i> , 2012
β -(1→2)GalpAT	XUT1	GT47	Peña <i>et al.</i> , 2012
α -(1→2)FucpT	MUR2/FUT1	GT37	Perrin <i>et al.</i> , 1999 ; Vanzin <i>et al.</i> , 2002
O-AcT	AXY4, AXY4L	-	Gille <i>et al.</i> , 2011

Des O-acétylations peuvent aussi être ajoutées exclusivement sur les résidus galactose du XyG par une XyG-O-acétyltransférase (AXY4), identifiée par Gille *et al.*, (2011). Cette acétyltransférase est également localisée dans l'appareil de Golgi (**Tab. 1**).

- Biosynthèse des pectines

En raison de la haute spécificité des GTs et de la diversité des polysaccharides pectiques, il est admis qu'au moins 67 transférases différentes sont requises pour leurs synthèses, incluant des GTs, méthyltransférases et acétyltransférases (Atmodjo *et al.*, 2013). Atmodjo *et al.* (2013) ont proposé deux modèles hypothétiques pouvant illustrer leurs synthèses : le modèle classique dit de «synthèse consécutive » et un modèle de « synthèse par domaines ». Le premier modèle consiste en la synthèse des pectines par ajout successifs des nucléotides-sucres sur un polymère en cours de synthèse au fur et à mesure de son acheminement à travers les compartiments *cis*-, *median*-, et *trans*-golgiens (**Fig. 14A**). Dans le second modèle, la synthèse des pectines s'effectue en blocs. Différents domaines pectiques sont synthétisés indépendamment comme dans le modèle classique puis seraient transférés en bloc sur une chaîne en cours de synthèse. Le polysaccharide ainsi formé est ensuite transporté vers la paroi par des vésicules de sécrétion (**Fig. 14B**).

La complexité de cette famille rend difficile la purification et l'identification des enzymes nécessaires à leurs synthèses. Ainsi, seules quatre familles de GTs ont été caractérisées d'un point de vue fonctionnel (**Tab. 2**) tandis que pour d'autres, seule une fonction putative a pu être attribuée par caractérisation phénotypique et biochimique de mutants (Orfila *et al.*, 2005 ; Mouille *et al.*, 2007 ; Miao *et al.*, 2011 ; Harholt *et al.*, 2012). Néanmoins, il apparaît que toutes sont des protéines membranaires de type II, possédant un seul domaine transmembranaire avec l'extrémité *N*-terminale orientée vers le cytoplasme et le domaine catalytique *C*-terminal orienté vers le lumen de l'appareil de Golgi.

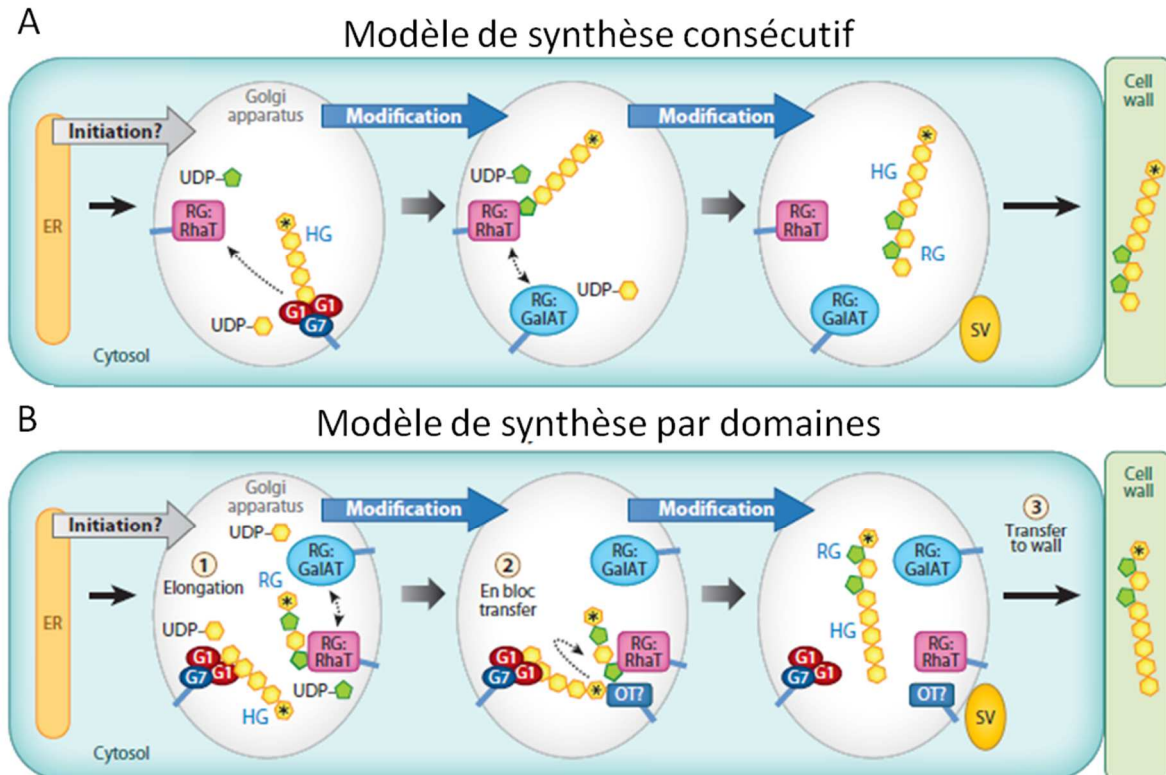


Figure 14 : Biosynthèse des pectines selon deux modèles hypothétiques. **A.** Le modèle de synthèse consécutive. Les GTs ajoutent consécutivement des sucres sur l'extrémité non réductrice d'un oligo- ou d'un polysaccharide en cours de croissance pour former le squelette et les chaînes latérales des pectines. Seules les GTs impliquées dans chaque étape sont représentées par souci de clarté. **B.** Le modèle de synthèse par domaines. La première étape **1** est l'élongation d'un domaine oligosaccharidique tel qu'une chaîne d'HG par le complexe GAUT1 : GAUT7 d' α -(1→4)-galacturonosyltransférases (G1-G7). Dans ce complexe, l'activité transférase est portée par GAUT1 tandis que GAUT7 aurait un rôle d'ancrage du complexe dans la membrane golgienne. Le domaine du RG-I serait synthétisé par des RG : rhamnosyltransférases (RG : RhaT) et des RG : galacturonosyltransférases (RG : GalAT) non encore identifiées. Puis, **2** transfère en bloc du domaine pectique par une oligosaccharyltransférase (OT) sur un autre domaine formant une structure plus conséquente. Cette étape a lieu jusqu'à ce que le polymère entier soit formé. La dernière étape **3** est le transfert du polysaccharide mature vers la paroi. A chaque étape des modifications telles que les méthylestérifications et/ou acétylations peuvent avoir lieu sur les sucres. Les hexagones jaunes modélisent les GalA et les pentagones verts les résidus Rha. ER : réticulum endoplasmique ; SV : vésicule de sécrétion. D'après Atmodjo *et al.*, 2013.

Tableau 2 : Liste des gènes impliqués dans la biosynthèse des pectines chez *Arabidopsis* dont l'activité transférase a été prouvée. GalT : galactosyltransférase ; GalAT : galacturonosyltransférase ; XylT : xylosyltransférase.

Activité	Gène	Famille CAZy	Références
Homogalacturonane			
α -(1→4)-GalpAT	GAUT1	GT8	Sterling <i>et al.</i> , 2006 ; Atmodjo <i>et al.</i> , 2011
Rhamnogalacturonane de type I			
β -(1→4)-GalpT	GALS1	GT92	Liwanag <i>et al.</i> , 2012
Rhamnogalacturonane de type II			
α -(1→3)-XylpT	RGXT1	GT77	Egelund <i>et al.</i> , 2006 ; Petersen <i>et al.</i> , 2009
α -(1→3)-XylpT	RGXT2	GT77	Egelund <i>et al.</i> , 2006 ; Petersen <i>et al.</i> , 2009
α -(1→3)-XylpT	RGXT3	GT77	Egelund <i>et al.</i> , 2008
α -(1→3)-XylpT	RGXT4/IMGP4	GT77	Liu <i>et al.</i> , 2011
Xylogalacturonane			
β -(1→3)-XylpT	XGD1	GT47-C	Jensen <i>et al.</i> , 2008

4. Organisation et interactions des polymères dans la paroi

L'architecture de la paroi primaire est souvent représentée comme une matrice de polysaccharides et de glycoprotéines divisées en plusieurs réseaux. Bien que la structure biochimique des polysaccharides pariétaux soit caractérisée, leur agencement dans la paroi et leurs interactions, créant un réseau fonctionnel avec une force de tension élevée tout en permettant l'expansion pariétale, sont moins connus. Plusieurs modèles ont vu le jour afin de représenter le plus fidèlement possible l'organisation et l'interaction des composés pariétaux à partir des données bibliographiques. Le premier modèle théorique a été proposé par Keegstra *et al.*, (1973) qui considère que tous les constituants de la paroi sont interconnectés par des liaisons covalentes, à l'exception de la cellulose reliée aux hémicelluloses par des liaisons hydrogènes, formant une seule macromolécule. Ainsi la croissance acide ne requiert pas nécessairement l'hydrolyse des liaisons covalentes mais seulement une dissociation des liaisons faibles entre cellulose et hémicellulose, permettant le glissement latéral des microfibrilles. Valent & Albersheim (1974) ont remis en cause cette théorie en démontrant qu'après acidification de la paroi les liaisons hydrogènes étaient, au contraire, renforcées. Un autre modèle, depuis longtemps adopté par la communauté scientifique, fut proposé par Carpita et Gibeaut (1993). Il tient compte de la direction du mouvement des microfibrilles au cours de l'expansion et de l'élongation cellulaire et distingue trois domaines en interaction mais structurellement indépendants.

a. Le réseau cellulose/hémicellulose

Le principal domaine est formé des microfibrilles de cellulose complètement recouvertes par les hémicelluloses *via* des liaisons hydrogènes. Celles-ci prises en « sandwich » entre deux microfibrilles permettent de les relier entre elles. Des analyses récentes par RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) (Dick-Pérez *et al.*, 2011) ainsi que des analyses par digestions enzymatiques (Park & Cosgrove, 2012) remettent en cause ce modèle et proposent une architecture différente. En effet, il existerait seulement quelques microdomaines de liaison cellulose/hémicellulose dans la paroi (**Fig. 15**), et moins de 10% de la cellulose serait couverte par les hémicelluloses.

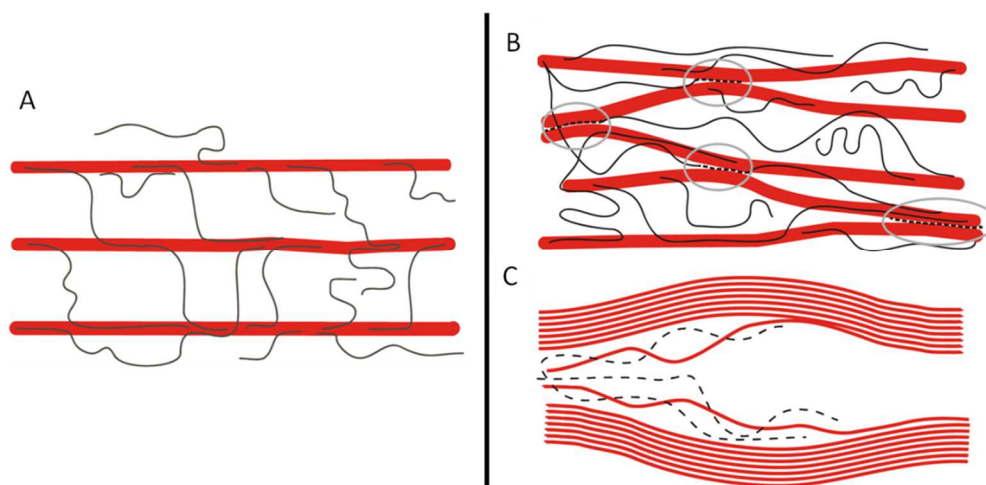


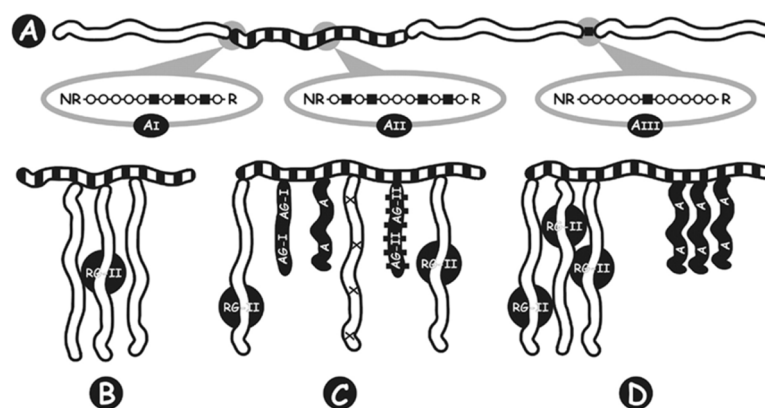
Figure 15 : Evolution du modèle structural de la paroi primaire. **A.** Modèle initial dans lequel les hémicelluloses (traits noirs) recouvrent la surface des microfibrilles de cellulose (cylindres rouges) et les relient entre elles. **B.** Evolution du modèle présenté en **A.** Les hémicelluloses sont représentées par des lignes pointillées entre les microfibrilles de cellulose. Ces régions, où les hémicelluloses connectent deux microfibrilles proches, sont entourées par un cercle gris. **C.** Vue détaillée des jonctions hypothétiques où les hémicelluloses sont entrecroisées avec les glucanes cellulosiques. D'après Park & Cosgrove, 2012a.

b. La place des pectines...révisée au cours du temps.

Le modèle de Carpita et Gibeaut (1993) décrit un deuxième réseau formé par les polysaccharides pectiques dans lequel s'intègre le premier réseau cellulose/hémicellulose. Les chaînes d'HG s'entrecroisent par des liaisons ioniques, hydrogènes ou encore par interactions de nature hydrophobe. Les DMs et d'acétylation ainsi que la distribution des groupements méthyl- et acétyl- déterminent également le profil d'interaction des pectines entre elles (Ralet *et al.*, 2003). Cette matrice pectique définit la porosité de la paroi et détermine la taille limite pour la diffusion des molécules. Ce modèle où les pectines constituent un réseau à part entière

a été une fois de plus remis en cause, puisque les pectines interagiraient *in vitro* avec la cellulose (Zykwinska *et al.*, 2005) probablement en compétition avec le XyG au moment de la synthèse des chaînes de cellulose. L'analyse de la paroi par RMN du solide en 2D suggère que les HGs et RG-I sont en contact avec 25 à 50% des microfibrilles de cellulose (Wang *et al.*, 2012). Les pectines se lieraient aux microfibrilles au niveau des régions dépourvues d'hémicellulose *via* les chaînes d'arabinanes et/ou de galactanes. De plus, des liaisons covalentes reliraient les XyGs aux pectines. Plusieurs études rapportent une coélution des deux polysaccharides après passage sur colonne échangeuse d'anions (Fu & Mort, 1997 ; Thompson & Fry, 2000) et des complexes covalents XyGs-pectines ont pu être extraits de cultures cellulaires de diverses espèces d'Angiospermes justifiant d'une conservation évolutive (Popper & Fry, 2005). L'existence de ce complexe, formée dans le cytoplasme, permettrait une incorporation facilitée du XyG dans la paroi (Popper & Fry, 2008). L'association cellulose-hémicellulose ne régirait donc pas seule les propriétés mécaniques de la paroi, il faudrait plutôt considérer un seul grand réseau pariétal incluant les pectines (Dick-Pérez *et al.*, 2011).

Alors, pourquoi les pectines ont-elles longtemps été décrites comme formant un réseau à part entière? En effet, outre leur interaction avec la cellulose, les différents polysaccharides pectiques, formant des micro-domaines, interagissent tous entre eux, rendant difficile leurs extractions et leurs purifications. Les HGs, le RG-I et le RG-II seraient liés au niveau de leur squelette et un traitement à l'EPG (O'Neill *et al.*, 1990) hydrolyse les liaisons glycosidiques et libère des fragments oligomériques. Deux modèles d'arrangement des pectines ont été proposés. Dans le premier modèle, les HGs et le RG-I se succèdent pour former un squelette linéaire, une région « lisse », où s'intercalent des résidus Rha, et les chaînes latérales du RG-I et du RG-II formeraient des régions « hérissées ». Dans le modèle alternatif proposé par Vincken et collaborateurs (2003), la partie linéaire serait formée par le RG-I tandis que les HGs et les autres composés pectiques sont considérés comme des chaînes latérales (**Fig. 16**).



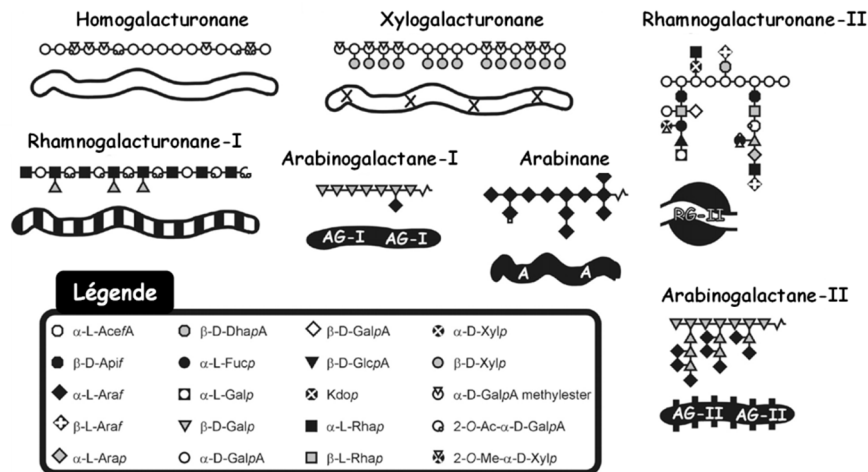


Figure 16 : Représentation schématique de la structure macromoléculaire des pectines. A. Dans ce modèle, le squelette pectique est constitué de chaînes d’HG et de RG-I et des résidus de rhamnose peuvent s’intercaler aux HG. Les régions dites “lisses” sont principalement composées d’HGs. Les régions dites “hérissées” se composent de RG-I, de XGA, d’arabinanes et d’AG-I. R : extrémité réductrice. NR : extrémité non réductrice. B-D. Autres modèles d’organisation des pectines. Le RG-I constitue la chaîne principale sur laquelle sont greffées des chaînes neutres (AG-I et II, et d’arabinanes), des HGs, du XGA et le RG-II. L’arrangement des chaînes latérales reste néanmoins hypothétique. La légende des monosaccharides et des polysaccharides de ces différents modèles est reportée en bas du schéma. D’après Vincken *et al.*, 2003.

Les liaisons intramoléculaires et intermoléculaires sont de nature ionique ou covalente mais leur connaissance reste limitée. Les liaisons entre les polymères pectiques se font par l’intermédiaire de ponts calciques entre les domaines d’HG en fonction de leur DM, formant le modèle en « boîte à œufs » précédemment décrit. Cette structure est particulièrement retrouvée dans les zones de jonction intercellulaire où elle agit comme un ciment (Caffal & Mohnen, 2009) et est fondamentale dans la structuration des pectines. Les composés phénoliques de la paroi peuvent également créer des connexions avec les pectines telles que les acides féruliques qui forment des liaisons ester en *O*-2 des résidus Ara et en *O*-6 des résidus Gal, formant des dihydrodimères (Morris & Ralet, 2012).

Le RG-II, capable de former des dimères par liaison diester de borate renforce également la cohésion des pectines (O’Neill *et al.*, 2001). De plus, le RG-II possède des liaisons covalentes avec les HGs. Par conséquent, la formation du dimère de RG-II entraîne la liaison entre deux chaînes d’HGs qui contribuerait à la formation d’une structure 3D *in muro* (Voragen *et al.*,

2009) et au renforcement des propriétés mécaniques de la paroi (Ryden *et al.*, 2003). L'ensemble des liaisons identifiées participant à la structuration des domaines pectiques est résumé dans la **figure 17**.

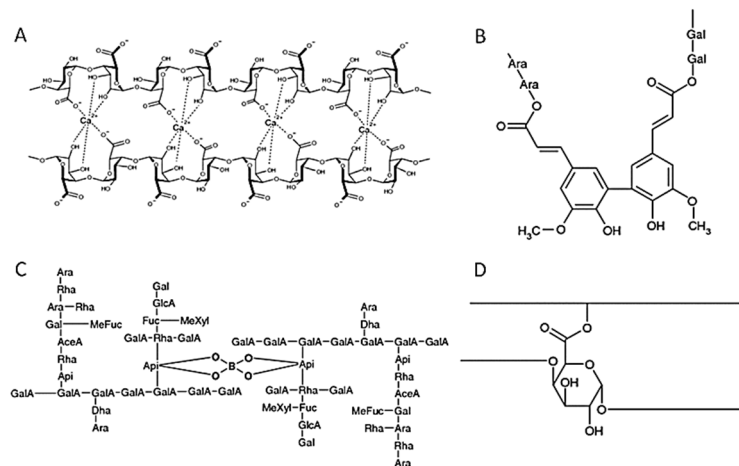


Figure 17 : Liaisons pectiques *in muro*. **A.** Liaison calcique entre deux chaînes d’HG formant le modèle en «boîte à œufs». **B.** Liaison entre les chaînes latérales des pectines et l’acide férulique. **C.** Dimérisation du RG-II par liaison ester de borate. **D.** Liaison ester covalente formée entre le groupement carboxyl d’un acide uronique et la fonction hydroxyle de deux chaînes pectiques. D’après Voragen *et al.*, 2009.

L’ensemble de ces données suggère donc que l’association cellulose-hémicelluloses n’est pas seule responsable des propriétés mécaniques de la paroi et que les polysaccharides pectiques ont un rôle central dans l’établissement d’un réseau pariétal unique (Dick-Pérez *et al.*, 2011). Enfin, la paroi ne serait pas formée de plusieurs domaines polysaccharidiques mais plutôt d’un seul réseau cohésif où les protéines forment un domaine relativement à part. Dans ce réseau, le bore et le calcium sont deux exemples illustrant la place importante des minéraux dans la paroi primaire.

c. Les minéraux dans la paroi

Depuis le XIX^e siècle, le calcium est reconnu comme étant un régulateur crucial de la croissance dans toutes les étapes du développement de la plante. Présent dans la paroi sous sa forme ionisée Ca^{2+} , il est en interaction avec les fonctions carboxyliques des HGs dé-méthylestérifiés. Ces structures en « boîtes à œufs » ont principalement été localisées dans les zones de renforcement et d’adhésion intercellulaire (Jarvis *et al.*, 2003). Le calcium stabiliserait également la formation du complexe borate-RG-II (Kobayashi *et al.*, 1999). Ainsi, à forte concentration de calcium extracellulaire, la paroi se rigidifie tandis qu’à plus faible concentration, la paroi est plus flexible. Une modification de la concentration calcique conduit

à des effets prononcés sur la croissance cellulaire (Hepler, 2005) et a un impact sur l'activité de certaines enzymes pariétales.

Le bore est un minéral essentiel pour la croissance de la plante (Warington, 1923). Le principal rôle physiologique du bore serait son rôle élémentaire dans la dimérisation du RG-II : sous sa forme anionique, le bore forme une liaison ester *cis*-diol avec le résidu apiose (Api) de la chaîne A de deux monomères de RG-II, ce qui génère un dimère (Ishii *et al.*, 1999). Il est d'ailleurs admis que la quasi-totalité du bore présent dans la plante est localisée dans la paroi primaire et plus précisément associée au RG-II (Kobayashi *et al.*, 1996). Ainsi, les besoins en bore de chaque espèce végétale seraient corrélés avec la proportion en pectines de leurs parois. Les effets délétères observés sur la morphologie et les propriétés mécaniques de la paroi lors d'une carence en bore (O'Neill *et al.*, 2004) seraient des effets secondaires suite à la perturbation de la structure du RG-II.

II. Le rhamnogalacturonane de type II : structure et propriétés

1. Structure primaire

Depuis sa découverte en 1978 dans des suspensions cellulaires d'érable sycomore (*Acer pseudoplatanus* L.) (Darvill *et al.*, 1978), le RG-II a été isolé de la paroi cellulaire de nombreuses plantes terrestres (Edashige & Ishii, 1998; Shimokawa *et al.*, 1999 ; Matsunaga *et al.*, 2004), révélant une structure hautement conservée au cours de l'évolution. Son squelette est différent de celui du RG-I puisqu'il s'agit d'unités de sept à neuf résidus d' α -(1→4)-GalAp (Pérez *et al.*, 2003). Les études structurales principalement menées par RMN (O'Neill *et al.*, 1996 ; du Penhoat *et al.*, 1999 ; Vidal *et al.*, 2000) et par spectrométrie de masse (Whitcombe *et al.*, 1995 ; Doco *et al.*, 2001) ont permis de détecter 4 chaînes latérales A, B, C et D, dont l'arrangement spatial n'est pas encore totalement déterminé.

La chaîne A est un octasaccharide, la chaîne B un heptasaccharide et les chaînes C et D sont des disaccharides. L'existence d'une cinquième chaîne, nommée E, reste sujet à controverse, puisque constituée seulement d'un résidu α -L-Araf (Rodríguez-Carvajal *et al.*, 2003). Une molécule de RG-II compte 13 monosaccharides différents (**Fig. 18**), dont certains sucres sont dits rares et/ou spécifiques tels que : l'Api, l'acide acérique (3-C-carboxy-5-désoxy-L-xylose; Ace), le 2-O-méthyl D-xylose (2-O-Me Xyl), le 2-O-méthyl L-fucose (2-O-Me Fuc), le L-galactose (L-Gal), l'acide 3-désoxy-D-lyxo-hept-2-ulonique (Dha) et l'acide 3-désoxy-

D-manno-oct-2-ulosonique (Kdo). Sur une molécule de RG-II, plusieurs résidus sont présents à la fois sous leurs deux formes anomériques (α - et β -), et cyclisées (furanose et pyranose). Cette structure reste globalement identique chez toutes les plantes terrestres malgré quelques variations possibles sur la chaîne B ainsi que la présence de méthylestérifications, méthyléthérifications et d'acétylations (Matsunaga *et al.*, 2004 ; Pabst *et al.*, 2013 ; Buffetto *et al.*, 2014).

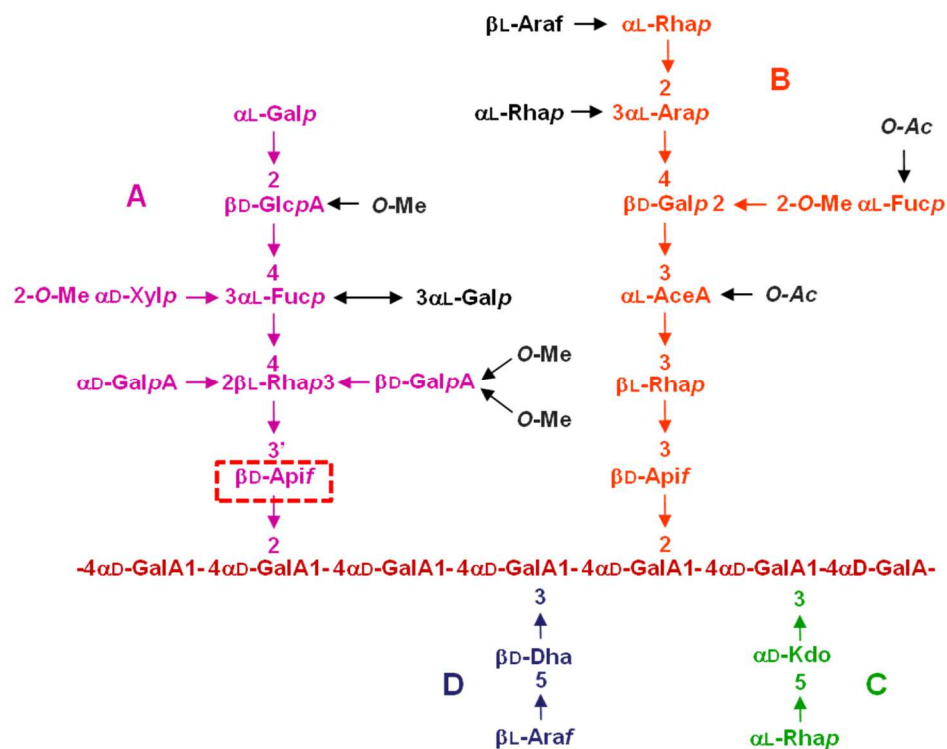


Figure 18 : Structure primaire du RG-II. Le RG-II est formé d'une chaîne de GalA substituée par 4 chaînes A, B, C, D. Les sucres ainsi que les dérivations en noir ne sont pas présents chez toutes les espèces végétales. Sur la chaîne A, l' α -Fuc peut être substitué par un α -Gal. Le résidu apiose encadré en rouge est impliqué dans la dimérisation.

2. Structure 2D et 3D du RG-II *in muro*

Nous avons vu précédemment la structure du monomère de RG-II. Or, celui-ci existe, *in muro*, à 90% sous forme dimérisée. L'identification du résidu impliqué dans la liaison diester de borate a été effectuée par analyse chimique. Les résultats de cette étude ont révélé que la liaison s'effectue en O-2 et O-3 du résidu apiose de la chaîne A de chaque monomère de RG-II (Fig. 17C). Il n'y a actuellement aucune évidence impliquant l'apiose de la chaîne B dans la dimérisation et un seul diester de borate serait nécessaire pour relier deux monomères de RG-

II (Ishii & Matsunaga, 1996; Kobayashi *et al.*, 1996 ; O'Neill *et al.*, 1996 ; Pellerin *et al.*, 1996 ; Kaneko *et al.*, 1997 ; Ishii *et al.*, 1999).

Certains facteurs influencent l'interconversion du dimère de RG-II en monomère et inversement. Par exemple, le dimère est converti en monomère et acide borique libre à pH 1 en seulement 30 minutes suite à l'hydrolyse des esters de borate à pH acide (Kobayashi *et al.*, 1996 ; O'Neill *et al.*, 1996). Tandis que le dimère de RG-II se forme *in vitro* à partir d'un pH de 3-4 et est stable à pH supérieur (**Fig. 19**). La présence de cations divalents (Sr^{2+} , Ba^{2+} , Pb^{2+}) ou trivalents (La^{3+} , Eu^{3+} , Ce^{3+} , Pr^{3+} ou Nd^{3+}) possédant un rayon ionique supérieur à 1,1 Å et 0,95 Å respectivement, facilite la formation du dimère. Mais ce serait la présence de deux ions calciques qui stabiliseraient le complexe *in muro* (O'Neill *et al.*, 2004). D'ailleurs, un traitement par des agents chélateurs comme l'EDTA conduit lentement vers la formation du monomère. Le mécanisme de formation du dimère est peu connu, néanmoins la vitesse de la réaction est assez lente ce qui suggère la nécessité d'une enzyme *in vivo* pour la catalyser (Funakawa & Miwa, 2015).

La capacité du RG-II à lier les cations divalents est intéressante pour la plante si des métaux lourds (Pb^{2+} , Al^{2+} , ...) sont présents dans le sol, réduisant leurs toxicités et leurs biodisponibilités. Pour cela, l'utilisation du RG-II a été proposé dans les processus de bioremédiation du sol (O'Neill *et al.*, 1996 ; Pellerin & O'Neill, 1998 ; Yapo, 2011). Une autre observation intéressante est la forte proportion de RG-II retrouvée dans le vin rouge (100-150 mg.L⁻¹), ce qui en fait une source avantageuse pour l'étude du polysaccharide. Le RG-II est extrêmement résistant aux enzymes microbiennes de dégradation des polysaccharides qui ne l'utilisent donc pas comme source de carbone. Les conditions du vin rouge, un pH situé entre 3 et 3,5 et la présence naturelle d'acide borique, sont en faveur de sa dimérisation et de sa liaison aux métaux lourds (Pb^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+}) pouvant être présents dans le vin. Ainsi, le RG-II limiterait potentiellement leur absorption dans le tractus gastro-intestinal.

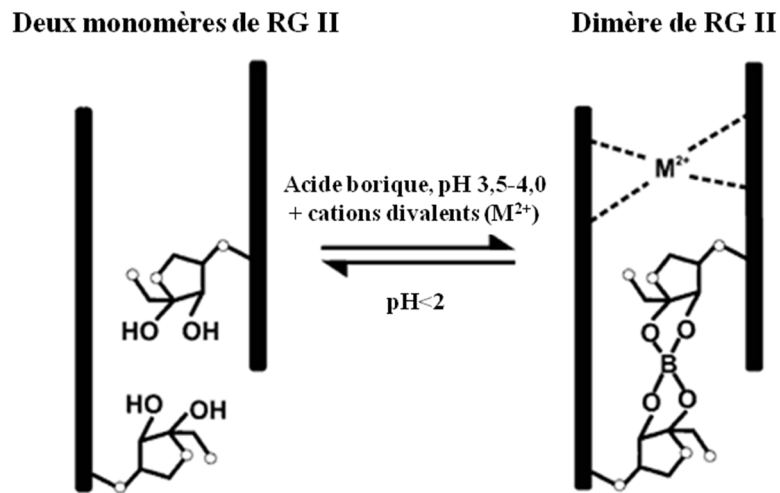


Figure 19 : Représentation schématique de la formation du dimère de RG-II en fonction des conditions du milieu. <http://www.crc.uga.edu/~mao/rg2/intro.htm>.

Une structure tridimensionnelle générale du RG-II dimérisé a été proposée par Pérez et collaborateurs (2003) grâce à des approches de RMN et de microscopie à force atomique. Le modèle présenté consiste en deux disques plats, chacun correspondant à un monomère d'une épaisseur de 17 Å, orientés parallèlement l'un par rapport à l'autre afin d'optimiser leur surface de contact (**Fig. 20**).

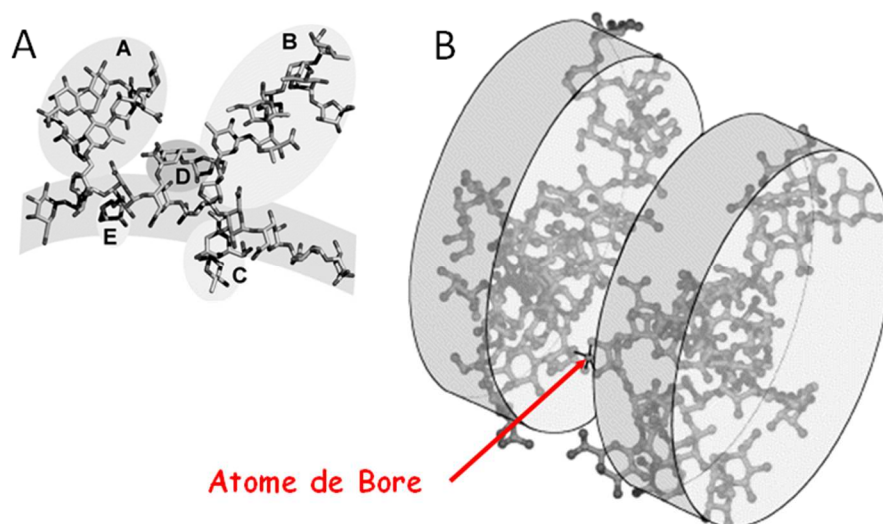


Figure 20 : Modélisation 3D du monomère (A) et du dimère de RG-II (B). D'après Pérez *et al.*, 2003.

A quelle étape de sa synthèse le RG-II se dimérise-t-il? Pour répondre à cette question et étudier les conditions de dimérisation, Chormova *et al.* (2014a) ont développé la technique

de PAGE (électrophorèse sur gel de polyacrylamide) appliquée au RG-II. Cette méthode a été utilisée sur une culture de cellules de rose capables de se développer dans un milieu dépourvu de bore, résultant en la monomérisation du RG-II. L'ajout de bore entraîne alors la formation de RG-II mais sans diminution du contenu en monomère laissant supposer que le RG-II monomérique associé à la paroi n'est plus capable de se dimériser et que seulement le RG-II nouvellement synthétisé l'est. Les résultats tirés d'autres traitements suggèrent que, *in vivo*, la dimérisation du RG-II a lieu durant sa biosynthèse *de novo* et/ou lors de sa sécrétion. La sécrétion du monomère vers la paroi constituerait un point de non-retour à une dimérisation ultérieure. Celle-ci peut se produire dans les corps golgiens ou lors de son acheminement dans les vésicules golgiennes vers la membrane plasmique ou bien encore au moment de l'exocytose au contact de la membrane.

3. Biosynthèse du RG-II

L'assemblage du RG-II implique, pour la plante, la synthèse d'au moins 12 nucléotides-sucres différents, et l'intervention de 22 GTs sans oublier les *O*-acétyl et *O*-méthyltransférases (Bar-Peled & O'Neill, 2011).

a. Les nucléotides-sucres rares ou spécifiques du RG-II

Dans cette partie, nous nous focaliserons sur la biosynthèse des α -céto-acides retrouvés dans la structure du RG-II tels que le Dha et le Kdo, les deux monosaccharides méthylés que sont le 2-*O*-Me Fuc et le 2-*O*-Me Xyl, le L-Gal ainsi que l'Api et l'Ace.

- Les α -céto-acides

Retrouvé dans la structure de nombreux glycannes bactériens, le Kdo est présent, chez les plantes terrestres, uniquement dans le RG-II. Le Kdo est généré par une série d'au moins 4 réactions enzymatiques. Tout d'abord, du D-arabinose-5-phosphate (D-Ara-5-P) est formé à partir de ribulose-5-phosphate par l'Ara-5-P isomérase. Le produit de cette réaction va réagir avec le phosphoénol pyruvate (PEP), catalysé par la Kdo-8-phosphate synthase (KDSA), pour conduire à la formation du Kdo 8-phosphate (Kdo-8-P). Ce précurseur sera par la suite déphosphorylé par une phosphatase, puis le Kdo sera activé sous forme CMP (CMP-Kdo) par une cytidyltransférase (KDSB), avant son entrée dans l'appareil de Golgi par un transporteur (**Fig. 21**). Par comparaison d'homologies de séquences avec les bactéries à Gram négatif, la majorité des gènes codant ces enzymes ont été identifiés chez les plantes. (Royo *et al.*, 2000a et 2000b ; Delmas *et al.*, 2003 ; Lalanne *et al.*, 2004 ; Delmas *et al.*, 2008 ; Smyth & Marchant,

2013). En particulier chez *Arabidopsis*, deux gènes codant pour une Kdo 8-P synthase, *AtKDSA1* (At1g79500) et *AtKDSA2* (At1g16340) ont été identifiés (Matsuura *et al.*, 2003). Ces gènes auraient été acquis chez les plantes par évènement de transfert de gènes horizontal à partir d'une eubactérie du genre *Chlamydia* (Royo *et al.*, 2000b). Bien que l'absence d'acide sialique chez les plantes ait été démontrée, plusieurs gènes homologues aux transporteurs de CMP-acide sialique ont été identifiés. Le transporteur codé par le gène *At5g41760*, chez *Arabidopsis* (*OsCSTLP1* chez *Oryza sativa*) est capable de compléter des cellules de mammifères déficientes dans le transport de CMP-acide sialique vers la lumière de l'appareil de Golgi (Bakker *et al.*, 2008 ; Takashima *et al.*, 2009). Ces protéines sont fortement pressenties pour transporter d'autres sucres activés sous forme CMP chez les plantes tels que le CMP-Kdo.

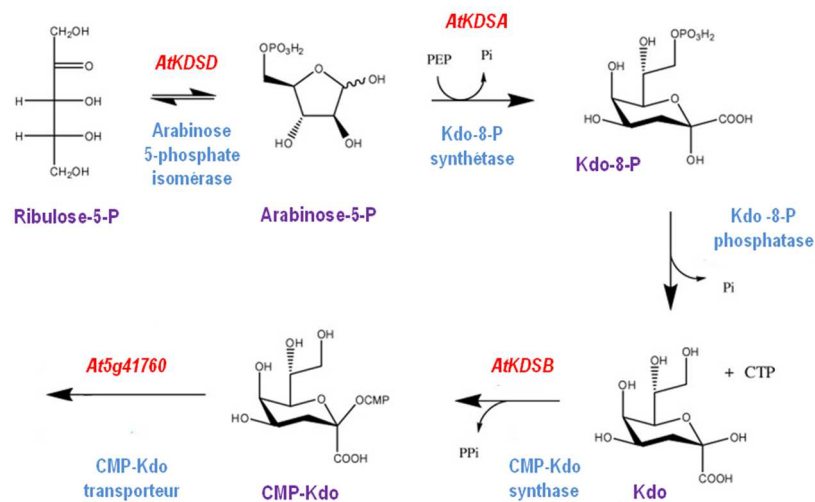


Figure 21 : Les étapes de la biosynthèse du CMP-Kdo.

En ce qui concerne la biosynthèse du Dha et sa forme activée, aucune information n'a été reportée à ce jour. La forte similarité structurale qui existe avec le Kdo suggère qu'ils aient des origines de synthèse commune et notamment l'utilisation du CMP pour la formation du sucre activé. Deux hypothèses relatives à la synthèse du Dha ont été émises. La première consiste en la formation d'un précurseur par condensation du PEP et d'une molécule de thréose par une enzyme 3-désoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase (Doong *et al.*, 1992). L'étape de déphosphorylation puis le transfert d'un groupement CMP qui suit, permettent la formation du CMP-Dha. La seconde hypothèse suggère la synthèse de la forme activée du Dha à partir du CMP-Kdo par des réactions d'oxydation et de décarboxylation (Mohnen, 2002).

- Le L-Gal

La forme activée du L-Gal est synthétisée dans le cytosol par interconversion du GDP-Man par la GDP-D-mannose-3,5-épimérase (GME, EC 5.1.3.18). Il est ensuite transféré vers l'appareil de Golgi pour être incorporé dans la structure du RG-II *via* une GDP-L-GalT mais peut également être converti dans le cytosol en L-Gal libre par des phosphorylases et des phosphatases spécifiques et constituer un intermédiaire de synthèse de l'acide ascorbique (Wolucka & Van Montagu, 2007 ; Gilbert *et al.*, 2009 ; Voxeur *et al.*, 2011).

- L'apiose

Les analyses biochimiques concernant la biosynthèse de l'apiose ont été menées chez les lentilles d'eau (*Lemna minor*) où l'apiose est retrouvé dans la structure de composés pectiques, les apiogalacturonanes (Golovchenko *et al.*, 2002), mais aussi chez le persil (*Petroselinum hortense*) où ce monosaccharide est présent dans les glucoconjugués flavoniques tels que les apiines (Hahlbrock *et al.*, 1976). L'UDP-Api serait formé à partir de l'UDP-GlcA par une première décarboxylation aboutissant à la formation d'un intermédiaire, le L-thréo-4-pentusulose puis par une série de contraction et d'épimérisation. Contre toute attente, l'UDP-apiose synthase isolée des lentilles d'eau et du persil permet également de générer de l'UDP-xylose à partir d'UDP-GlcA probablement à partir du même intermédiaire. Ainsi, une unique UDP-apiose /UDP-xylose synthase catalyserait la formation d'UDP-Api et d'UDP-Xyl (Mølhøj *et al.*, 2003).

- Les sucres méthylés

Actuellement, il n'a pas encore été déterminé si la O-méthylation des sucres a lieu sur la forme nucléotide-sucre ou bien après incorporation du sucre dans la structure du polysaccharide (Bar-Peled & O'Neill, 2011). Cependant la chaîne B du RG-II chez le mutant *mur1*, affecté dans la voie de biosynthèse du GDP-L-Fuc, présente un résidu 2-O-méthyl L-Gal qui remplace le résidu 2-O-méthyl L-Fuc (Reuhs *et al.*, 2004). Cette substitution suggère donc que la méthylation se produit après production du nucléotide-sucre.

- L'acide acérique

Tout comme le Dha, la biosynthèse de l'Ace fait partie des énigmes à résoudre pour une caractérisation complète de la formation du RG-II. La nature du nucléotide-sucre associée reste inconnue (Bar-Peled *et al.*, 2012).

b. Les glycosyltransférases

La complexité de la structure du RG-II, conférée par la présence de 13 résidus sucre différents et de 22 liaisons glycosidiques, nécessitent un nombre important de GTs pour sa synthèse, soit plus de la moitié des GTs requises pour la biosynthèse des pectines. Actuellement, seule une α -(1→3)-XylT (RGXT) entrant dans la biosynthèse du RG-II a été caractérisée biochimiquement (Egelund *et al.*, 2006, 2008 ; Petersen *et al.*, 2009). L'étude de son activité enzymatique a révélé la capacité de transférer un résidu D-xylose à partir de l'UDP- α -D-xylose sur un résidu L-fucose. Chez les plantes supérieures, cette combinaison n'est retrouvée qu'au niveau de la chaîne A du RG-II. Cette protéine membranaire de type-II, localisée dans l'appareil de Golgi, appartient à la famille CAZy GT77 contenant 4 membres chez *Arabidopsis* (RGXT1-4). En revanche, une seule isoforme a été retrouvée chez *Physcomitrella patens* (McCarthy *et al.*, 2014) suggérant l'existence d'une seule copie chez l'ancêtre commun des plantes terrestres avant la divergence des bryophytes et des trachéophytes. L'étude du mutant *nolac-H18* chez le tabac (*Nicotiana plumbaginifolia*), affecté dans l'expression du gène *GUT1* codant pour une glucuronyltransférase, a longtemps été associée à la synthèse du RG-II (Iwai *et al.*, 2002, 2006). La mutation entraînerait un défaut de dimérisation du RG-II dû à l'absence de transfert du résidu GlcA sur le fucose de la chaîne A. Cependant cette analyse a été remise en cause par Wu et collaborateurs en 2009, qui ont étudié deux gènes *IRX10* et *IRX10-L* (*GUT2* et *GUT1* respectivement) chez *Arabidopsis*, étroitement lié à *NpGUT1*. Leurs conclusions attribuent aux gènes *GUT* un rôle dans la synthèse du xylane présent dans la paroi secondaire des plantes sans aucune altération du RG-II. Les résultats d'Iwai *et al.*, s'en trouvent d'autant plus controversés que les mutants *irx10* et *irx10-L* sont complémentés par l'expression de *NpGUT1*.

Par homologie avec les gènes bactériens, un gène monocopie codant une Kdo-transférase putative a été identifié chez *Arabidopsis* (*AtKDTA*, At5g03770) (Wu *et al.*, 2004). Cependant, l'analyse du mutant n'a pas révélé d'altération structurale de la chaîne C du RG-II. La localisation de la protéine étant mitochondriale (Séveno *et al.*, 2010), il a été suggéré un rôle ancestral dans la synthèse d'une molécule apparentée au lipide A retrouvé dans le lipopolysaccharide des bactéries à Gram négatif. Les précurseurs de synthèse du lipide A ont été découverts chez *Arabidopsis* (Li *et al.*, 2011) mais la présence de ce lipide à proprement parlé n'a pas été démontrée. Le RG-II reste, à ce jour, la seule molécule contenant du Kdo chez les plantes. Deux autres gènes, At1g08660 et At3g48820, proches des SiaTs ont été identifiées. Les protéines correspondantes, SIA1 et SIA2, ont été localisées dans l'appareil de Golgi (Dunkley *et al.*, 2006; Daskalova *et al.*, 2009) et possèdent 4 motifs conservés, caractéristiques

des SiaTs (Audry *et al.*, 2011). Le Kdo et le Dha présentent des caractéristiques de synthèse et de structure communes avec l'acide sialique (**Fig. 22**), telles que la condensation cytosolique du PEP avec un monosaccharide phosphate ainsi que le couplage avec un nucléotide monophosphate pour générer la forme activée. Compte-tenu de l'absence de ce dernier chez les plantes (Séveno *et al.*, 2004 ; Zeleny *et al.*, 2006), il a été proposé que ces SiaTs-like soient impliquées dans le transfert du Kdo et/ou du Dha sur le squelette HG du RG-II.

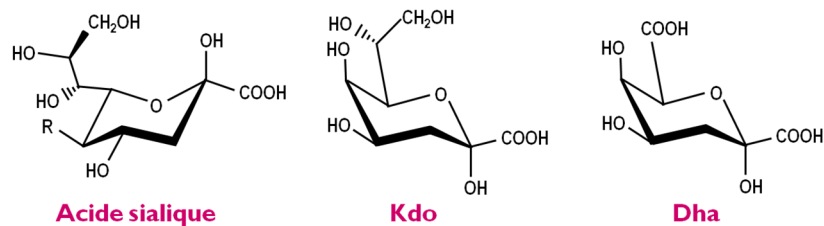


Figure 22 : Structure de l'acide sialique, du Kdo et du Dha.

Voxeur *et al.* (2012) ont identifié 26 gènes codant pour des GTs potentiellement impliquées dans la synthèse du RG-II. Ceci d'une part, par analyse de coexpression d'une série de gènes chez *Arabidopsis* et chez le riz (*Oriza sativa*) co-exprimés avec d'autres gènes préalablement assimilés à la synthèse du RG-II et d'autre part par l'étude de leurs surexpressions sous traitement à l'isoxaben. Cet herbicide affecte la synthèse de la cellulose et est compensée au niveau de la paroi par une surexpression des gènes codant pour la synthèse des pectines. Dix séquences appartenant aux familles CAZy GT4, 8, 29, 31, 68 et 92 et 16 séquences non assimilées à une famille CAZy ont ainsi été sélectionnées. Dans cette étude, concernant la famille CAZy GT29, deux gènes homologues aux SiaTs de mammifères ont été retenus chez *Arabidopsis* (At1g08660, At3g48820). Néanmoins, aucune d'entre elles n'a révélé d'activité SiaT *in vitro*. La troisième séquence At1g08280 prédite GT29, coderait en réalité pour une GalT (Dilokpimol *et al.*, 2014). Cette étude apporte une base de travail importante pour compléter les connaissances portant sur la biosynthèse du polysaccharide le plus complexe de la paroi cellulaire, ainsi que pour élucider ses fonctions biologiques.

4. Fonctions physiologiques du RG-II

Pourquoi une molécule si complexe, nécessitant une machinerie cellulaire consommatrice d'énergie, est-elle retrouvée dès la colonisation de la Terre par les plantes, il y a 480 millions d'années, des bryophytes jusqu'aux gymnospermes, avec une structure très conservée? Pour

aborder la fonction du RG-II *in planta*, deux stratégies ont été menées, une approche par génomique fonctionnelle ou une approche pharmacologique (inhibiteurs) de plantes affectées dans la structure et/ou la dimérisation du RG-II. Nous ferons également un point sur les symptômes d'une déficience en bore puisque la quasi-totalité de ce minéral présent chez les plantes vasculaires est localisé au niveau de la paroi, lié au RG-II.

a. Approche par génomique fonctionnelle : approche structure-fonction

La disponibilité de plantes mutantes arborant une composition de leur paroi cellulaire altérée apporte l'opportunité de mettre en relation un gène muté et son rôle dans les processus biologiques. La séquence complète du génome de la plante modèle, *Arabidopsis*, est disponible depuis 2000. Par la suite, plusieurs méthodes ont été utilisées pour modifier l'expression d'un gène. En l'occurrence, la mutagenèse insertionnelle, consiste en l'insertion d'un ADN (acide désoxyribonucléique) étranger, appelé ADN de Transfert (ADN-T) qui va perturber l'expression d'un gène et provoquer, dans la majorité des cas, son inactivation. Ainsi, des banques de mutants sont disponibles chez *Arabidopsis*, avec plusieurs sites d'insertion pour un gène donné. La mutagenèse classique quant à elle (mutagenèse chimique, par rayonnement...), entraîne plutôt des changements de base ou des micro-délétions dans la séquence du gène.

- Synthèse d'un monomère spécifique

Le premier mutant étudié, affecté dans la structure du RG-II, fut le mutant *mur1* (*murus1*). Ce mutant, dont le gène *GMD2* inactivé code pour une GDP-mannose 4,6-déshydratase impliqué dans la synthèse du L-fucose (6-désoxy-L-Gal, Bonin *et al.*, 1997), ne contient que 2% de L-Fuc dans ses parties aériennes. Il en résulte un phénotype nain de la plante et des tiges plus fragiles, symptômes caractéristiques d'une déficience en bore. La proportion de RG-II pariétal reste inchangée mais seule la moitié de ce composé pectique est sous forme dimérisée. Ceci serait dû à la substitution des résidus L-Fuc et 2-O-Me L-Fuc par du L-Gal et du 2-O-Me L-Gal respectivement (O'Neill *et al.*, 2001 ; Reuhs *et al.*, 2004). L'apport exogène de L-Fuc (10 mM) ou de bore en concentration supérieure à la normale (2,5 mM) permet à la plante de retrouver un phénotype normal (**Fig. 23**). Par ailleurs, la quantité de 2-O-Me Xyl, diminuée de 50% chez *mur1*, est restaurée par l'ajout de L-Fuc, suggérant que la XylT a plus d'affinité envers le L-Fuc que le L-Gal pour le transfert du 2-O-Me Xyl sur la chaîne A.

Il est intéressant de faire le parallèle avec le mutant *mur2*, affecté dans la synthèse d'une FucT spécifique du XyG, qui présente en conséquence une forte diminution de XyG fucosylé mais qui pourtant n'a aucun phénotype (Vanzin *et al.*, 2002). Alors qu'en revanche, l'étude de

mur1, supporte l'hypothèse que la conservation de la structure du RG-II est importante pour assurer sa capacité à se dimériser en présence de bore et une croissance normale de la plante.

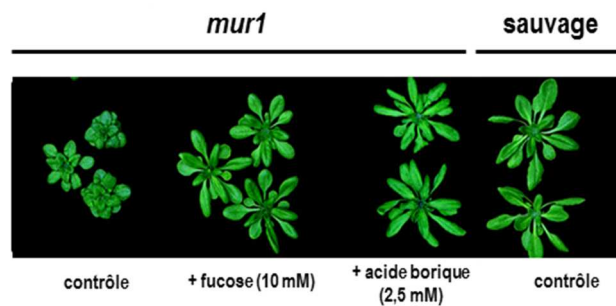


Figure 23 : Phénotype du mutant *mur1*. Le mutant *mur1* présente un phénotype nain par rapport à une plante sauvage. L'ajout de bore ou de fucose restaure ce phénotype. D'après O'Neill *et al.*, 2001.

Présent dans la paroi cellulaire uniquement dans la composition du RG-II, le D-apiose sert de point de liaison des chaînes A et B sur le squelette HG du polysaccharide et intervient dans la dimérisation du RG-II en formant une liaison diester avec un ion borate. Deux gènes codant pour une UDP-D-apiose/UDP-D-xylose synthase (AXS) ont été identifiés chez *Arabidopsis*, *AXS1* (At2g27860) et *AXS2* (At1g08200). L'étude du mutant *knock-out axS1* n'a pas révélé de phénotype, ce qui suggère que *AXS2* compense l'inactivation d'*AXS1* (Mølhøj *et al.*, 2003). L'étude du gène homologue chez *Nicotiana benthamiana* fut plus informative. En effet, l'altération partielle de l'expression du gène *NbAXS1* conduit à une plante naine et un épaissement pariétal, accompagné d'une réponse de défense (jaunissement des feuilles, mort cellulaire). L'étude de la composition de la paroi des cellules foliaires de *N. benthamiana* affectées révèle une diminution du contenu en D-apiose, 2-O-Me Xyl et 2-O-Me Fuc, traduisant une déficience en RG-II. L'altération de la structure du RG-II expliquerait les phénotypes observés (Ahn *et al.*, 2006).

L'étude des mutants affectés dans la synthèse du Kdo fut aussi une stratégie appliquée à l'étude de la biosynthèse du RG-II et de sa (ses) fonction(s). Le Kdo constitue avec un résidu de L-Rha la chaîne C du RG-II. Ainsi, l'altération de la synthèse de cet α -céto-acide devrait entraîner l'absence de chaîne C sur le RG-II. Les mutants *AtkdsA1* et *AtkdsA2* (Delmas *et al.*, 2008) affectés dans l'expression de la Kdo-8-phosphate synthase ne présentent pourtant aucun phénotype, bien qu'une chute de 90% de la quantité de Kdo cytosolique soit reportée chez le mutant *AtkdsA2*. Ceci peut s'expliquer par une redondance des deux isoformes. La synthèse du Kdo dans les cellules serait en excès et les 10% de Kdo restant seraient suffisants à son

incorporation dans le RG-II et au bon développement de la plante. Ainsi, l'obtention d'un double mutant par croisement des plantes mutées aurait permis de déterminer la fonction du gène mais aucun double mutant homozygote n'a pu être produit. Ceci peut s'expliquer par un défaut de fonctionnement des organes reproducteurs mâles et/ou femelle des simples mutants. L'étude de la croissance du pollen des plantes mutantes *Atkdsa1/Atkdsa2* a permis de déterminer que les grains de pollen étaient inaptes à former un tube pollinique normal et ainsi assurer la fécondation des ovules. De même, aucun mutant homozygote affecté dans l'expression de la CMP-Kdo synthétase (gène *KDSB* présent en une seule copie chez *Arabidopsis*) n'a pu être obtenu (Kobayashi *et al.*, 2011). L'analyse du pollen du mutant hétérozygote a révélé un défaut d'élongation, suggérant, avec l'étude précédemment citée, que l'intégrité structurale du RG-II est nécessaire à l'élongation cellulaire du tube pollinique (Kobayashi *et al.*, 2011).

Chez la tomate, les plantes possédant un acide ribonucléique interférant (ARNi) ciblant les gènes *GME1* et *GME2* codant deux isoformes de la GDP-D-mannose-3,5-épimérase sont affectées dans la synthèse du GDP-L-Gal. Ces transformants se caractérisent par une taille réduite et une fragilité accrue des tiges. Les quantités pariétales de galactose et de mannose sont réduites dans les tiges et les fruits et une déficience en acide ascorbique est également reportée (Gilbert *et al.*, 2009). Un apport exogène d'acide ascorbique et de L-Gal permet de rétablir la quantité d'acide ascorbique de la plante à une valeur contrôle mais sans pour autant restaurer le phénotype sauvage. Ces résultats suggéreraient ainsi que le phénotype n'était pas dû à la carence en acide ascorbique mais plutôt à un défaut d'incorporation du L-Gal dans le RG-II, altérant sa structure. Voxeur *et al.* (2011) ont ainsi analysé le RG-II des deux lignées ARNi et ont montré que la chaîne A était dépourvue de L-Gal, s'accompagnant d'un défaut de dimérisation de l'ordre de 20% du RG-II. Ces effets, ainsi que le phénotype, sont rétablis par ajout de bore dans le milieu ce qui confirme que l'altération structurale seule du RG-II affecte le réseau pectique tridimensionnel de la paroi primaire nécessaire au développement et à la croissance de la plante.

- Glycosyltransférases

Comme décrit précédemment, une seule GT spécifique du RG-II a été caractérisée biochimiquement. Cette α -(1→3)-XylT est codée par une famille de 4 gènes (*RGXT1-4*), qui ont révélé une activité enzymatique *in vitro* (Egelund *et al.*, 2006 ; 2008 ; Liu *et al.*, 2011). Cependant, les mutations des gènes *RGXT1* et *RGXT2* ne présentent ni altération de la structure du RG-II ni phénotype visible. Aucun mutant *RGXT3* n'est disponible à ce jour. Ainsi, une

caractérisation fonctionnelle a été décrite seulement pour le gène *RGXT4* dénommé *MGP4* (*Male Gametophyte Defective 4*, At4g01220) (Liu *et al.*, 2011). Les mutants *mgp4-1* et *mgp4-2*, correspondant à deux mutations d'insertion différentes dans le même gène, sont fortement affectés dans la croissance du tube pollinique et la transmission des gamètes mâles. Par conséquent, très peu, voire aucun mutant homozygote n'a été obtenu pour les mutants *mgp4-1* et *mgp4-2* respectivement. Afin de générer des plantes *mgp4-2* homozygotes, la séquence d'acide désoxyribonucléique complémentaire (ADNc) correspondante au gène *MGP4* fut introduite sous contrôle d'un promoteur pollen spécifique dans les plantes hétérozygotes *mgp4-2/+* permettant la restauration du phénotype observé au niveau du pollen. Les plantes homozygotes révèlent un gonflement des cellules racinaires, un défaut de croissance racinaire ainsi qu'un défaut de structure du RG-II (Liu *et al.*, 2011). En effet, l'activité enzymatique de *MGP4*, étudiée *in vitro* dans la levure *Pichia pastoris*, suggère fortement son implication dans la formation de la séquence D-Xyl- α -(1 \rightarrow 3)-L-Fuc constitutive de la chaîne A du RG-II. Les analyses biochimiques renforcent cette idée puisque la quantité de MeXyl dans la fraction pectique et le taux de dimérisation du RG-II sont réduits. L'apport exogène de bore permet de restaurer partiellement le phénotype racinaire ce qui renforce l'hypothèse que le RG-II joue un rôle fondamental dans la mise en place de la paroi primaire et que l'altération de sa structure, et en particulier au niveau de la chaîne A, entraîne des défauts de croissance importants.

L'analyse phénotypique du mutant *sial* (Deng *et al.*, 2010), affecté dans l'expression d'une SiaT-like putative, révèle l'importance de ce gène dans la germination et la croissance du tube pollinique. Le mutant étant fortement affecté dans la transmission du gamète mâle. Cependant, aucune étude biochimique permettant de prouver l'altération de la structure du RG-II n'a été menée sur ce mutant.

- Apport des mutants Bore

L'utilisation du bore par les plantes nécessite le transport du minéral du sol vers les cellules racines puis vers les tissus aériens. En plus de la diffusion passive à travers les membranes, le transport du bore est facilité par la présence de transporteurs. Pour faire le lien avec le RG-II, il convient de rappeler que plus de 80% du bore contenu dans la paroi est impliqué dans la liaison de deux monomères de RG-II (Matoh *et al.*, 1993 ; Kobayashi *et al.*, 1996) et que le ratio RG-II monomérisé/RG-II dimérisé d'un tissu est un bon indicateur du statut nutritionnel en bore (Matsunaga & Ishii, 2006). Deux types de transporteurs ont été distingués, des canaux qui facilitent l'entrée du bore présent dans le sol en condition de carence, tels que NIP5 ; 1 et NIP6 ; 1 chez *Arabidopsis* (Takano *et al.*, 2006 ; Takana *et al.*, 2008) et des transporteurs d'acide

borique/borate qui permettent l'efflux du bore vers la paroi. Le premier transporteur identifié fut BOR1 (Noguchi *et al.*, 1997). Ce transporteur est localisé au niveau de la membrane plasmique et est responsable de l'import de bore dans le xylème. Le mutant *bor1* requiert une concentration plus élevée en bore pour assurer une croissance normale des parties aériennes, les parties racinaires n'étant pas affectées par la mutation (Takano *et al.*, 2001). Aucun phénotype n'est observé en conditions normales de bore. A faible concentration en bore (3 μM), la composition monosaccharidique de la paroi de *bor1* reste inchangée, en revanche, 60% du RG-II est sous forme monomérisée contre seulement 10% chez les plantes sauvages, (que ce soit en condition normale ou de carence en bore). Une concentration élevée en bore (30 μM) restaure le taux de dimérisation du RG-II et la croissance de la plante. Ainsi, le phénotype observé est très probablement une conséquence du défaut de dimérisation du RG-II.

Plus récemment, un second transporteur de bore, BOR2, paralogue de BOR1, a été décrit chez *Arabidopsis* (Miwa *et al.*, 2013). Il est également localisé dans la membrane plasmique. Lors d'une carence en bore, le mutant *bor2* est, contrairement à *bor1*, altéré dans l'élongation racinaire alors que les parties aériennes sont moins affectées. De plus, seulement 45% du RG-II est dimérisé dans les cellules racinaires alors qu'un minimum de 50% de dimérisation est nécessaire pour assurer une croissance racinaire normale (Miwa *et al.*, 2013). La quantité de bore dans les racines reste inchangée, ainsi, BOR2 favoriserait en conditions de déficience en bore la remobilisation du bore présent dans le cytosol vers la paroi pour maintenir une dimérisation du RG-II. BOR2 permettrait également de concentrer l'acide borique/le borate dans les vésicules de sécrétion afin de faciliter sa dimérisation avant sa sécrétion vers la paroi (Fig. 24).

Le double mutant *bor1/bor2* présente un sévère défaut de croissance mais seulement en condition de carence en bore. Les transporteurs BOR1 et BOR2 semblent jouer deux rôles en partie distincts. Le transport d'acide borique/borate par BOR2 vers l'apoplaste est nécessaire à la dimérisation du RG-II et à l'élongation racinaire, tandis que BOR1 est responsable du chargement en bore du xylème pour alimenter les parties aériennes (Miwa *et al.*, 2013)

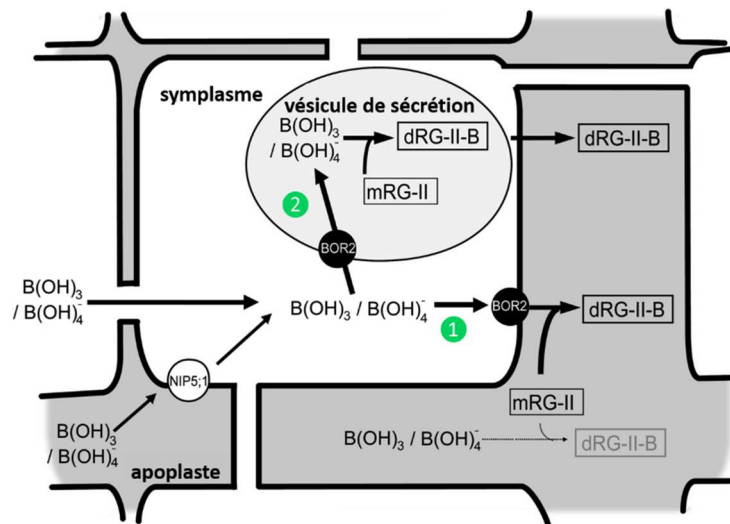


Figure 24 : Représentation schématique du rôle de BOR2 dans les cellules racinaires en condition de carence en bore. Après l'entrée du bore dans la cellule, ① la première hypothèse est que l'acide borique/le borate serait exporté hors de la cellule par BOR2 vers l'apoplaste où il est utilisé pour la dimérisation des monomères de RG-II. ② La seconde hypothèse est que BOR2 concentrerait l'acide borique/le borate dans les vésicules de sécrétion pour faciliter la dimérisation du RG-II dans ces vésicules avant d'être sécrété vers l'apoplaste. D'après les travaux de Chormova *et al.* (2014a et b), la première hypothèse ne pourrait être admise puisque la dimérisation des molécules de RG-II n'est plus possible après sa sécrétion. L'épaisseur des flèches indique l'efficacité de la réaction. mRG-II : monomère de RG-II ; dRG-II : dimère de RG-II. D'après Miwa *et al.*, 2013.

En parallèle, d'autres études, portant sur les symptômes observés sur des plantes carencées en bore révèlent l'importance du bore et de la dimérisation du RG-II pour le développement des plantes.

b. Effets d'une déficience en bore

L'une des stratégies utilisées pour déterminer la fonction du bore dans la paroi cellulaire est de comparer la réponse à une déficience en bore de cellules végétales en phase de division, qui synthétise une paroi primaire, avec des cellules en phase stationnaire qui ne synthétisent quasiment plus de paroi (Fleisher *et al.*, 1998, 1999). En effet, les cellules de *Chenopodium album* L. en phase de division, carencées en bore, ont une taille des pores pariétaux augmentée et la culture cellulaire se caractérise par des cellules détachées et une turbidité élevée. Ces symptômes témoignent d'un réseau pectique désorganisé, or, la dimérisation du RG-II, dépendante du bore, régule la conformation macroscopique du réseau pectique nécessaire à une croissance cellulaire normale.

A l'échelle de l'organisme entier, des plantes de courge musquée (*Cucurbita moschata* Duchesne) cultivées en conditions de carence en bore ont une croissance inhibée et les parois des cellules sont gonflées (Ishii *et al.*, 2001). La structure du RG-II reste inchangée mais le gonflement peut s'expliquer par le défaut de dimérisation du RG-II altérant les propriétés mécaniques de la paroi puisque l'ajout d'acide borique à la culture cellulaire conduit en 10 minutes à la formation de RG-II dimérisé. L'étude menée sur *Arabidopsis in vitro* par Abreu *et al.* (2014), met en relation le phénotype observé lors d'une déficience en bore, c'est-à-dire, un défaut d'élongation de la racine primaire et un phénotype « hérissé » de la racine qui développe de nombreux poils absorbants, avec une altération des signaux hormonaux nécessaires à la croissance racinaire. De plus, les protéines impliquées dans la réponse aux cytokinines, responsables de la transition de l'état de division cellulaire vers l'état de différenciation, sont sous-exprimées entraînant un arrêt prématuré de la différenciation du xylème chez les plantes déficientes en bore (Abreu *et al.*, 2014). Des observations similaires avaient déjà été rapportées sur le pois (*Pisum sativum*) (Li *et al.*, 2001). Dans cette étude, une carence en bore entraîne dans un premier temps une réduction de la synthèse des cytokinines dans les apex caulinaire et racinaire, puis une perturbation de la synthèse et du transport polarisé de l'auxine. Ainsi, un défaut d'élongation des parties aériennes et une croissance prématurée de bourgeons latéraux sont observés.

La perturbation des signaux hormonaux lors d'une carence en bore serait responsable des effets observés très tôt sur le développement des plantes, en particulier dans les racines (Blilou *et al.*, 2005 ; Martín-Rejano *et al.*, 2011). Le lien avec la dimérisation du RG-II n'est pas encore bien établi, néanmoins, le bore étant impliqué dans la dimérisation du RG-II et le rôle du RG-II dans la croissance étant démontré, nous pouvons imaginer que l'inhibition de la croissance cellulaire par un défaut de signal hormonal, influence le réseau pectique.

Le bore, reconnu comme agent de réticulation, serait également impliqué dans la connexion membrane plasmique-paroi nécessaire à l'intégrité structurale de la cellule (Bassil *et al.*, 2004). Plus précisément, il formerait des liaisons avec les groupements *cis*-diols des glycosyl inositol phosphoryl céramides (GIPCs), sphingolipides majoritaires chez les plantes, retrouvés au niveau des radeaux lipidiques dans la membrane. *In vitro*, l'ajout de GIPC favoriserait la dimérisation de RG-II. Ainsi, le RG-II complexé au bore a été proposé comme point d'attache entre la paroi et la membrane plasmique (Voxeur & Fry, 2014).

Les phénotypes décrits ci-dessus, tirés des études portant sur les symptômes d'une carence en bore ou sur des mutants affectés dans le transport du bore et *a fortiori* dans la structure 3D

du RG-II, permettent d'allouer un rôle fondamental de ce motif pectique dans la mise en place de la paroi et l'élongation cellulaire.

c. Approche pharmacologique

L'approche pharmacologique consiste à utiliser des analogues structuraux de molécules naturelles qui agissent comme inhibiteur en bloquant une voie métabolique et une fonction physiologique de l'organisme.

- Les acides boroniques

Les acides boroniques, analogues structuraux du bore, contiennent seulement deux groupements hydroxyles (**Fig. 25A**) capables de former des liaisons *cis*-diols mais sans pour autant dimériser deux molécules. Ainsi, les acides boroniques qui ont un pKa plus faible que l'acide borique se lient au RG-II à la place du bore et inhibe la dimérisation (Bassil *et al.*, 2004). L'ajout d'acides boroniques à des cultures cellulaires de tabac (*Nicotiana tabacum*) engendre des changements morphologiques critiques (Bassil *et al.*, 2004). Les plasmodesmes des cellules adjacentes sont disloqués et l'ancrage des membranes cellulaires à la paroi est restreint à quelques zones d'attachement (**Fig. 25B et C**). Un lavage des cellules, permettant d'enlever les acides boroniques du milieu, suivi par un ajout de bore ne restaure pas le phénotype. En revanche, l'inhibition considérable de la germination du pollen de pétunia par l'ajout d'acide phénylboronique au milieu de germination est restaurée par une forte concentration de bore suggérant une compétition entre les deux molécules pour l'accès à leur site de fixation. Il reste à démontrer la liaison des acides boroniques au RG-II afin d'allouer les phénotypes observés à un défaut de dimérisation (Bassil *et al.*, 2004).

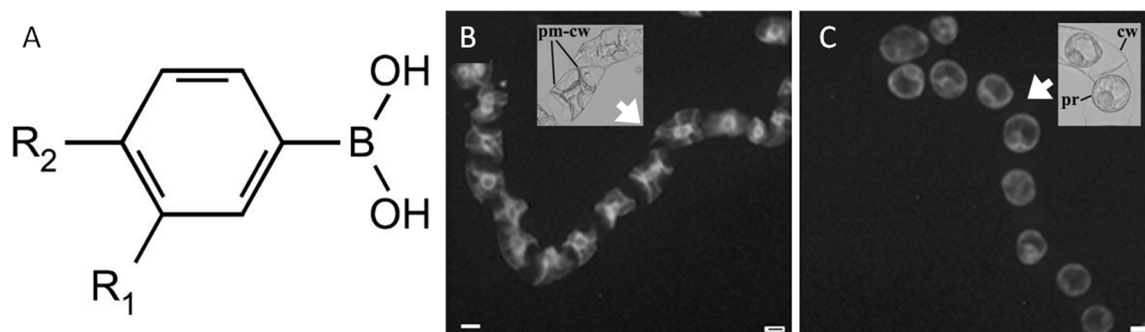


Figure 25 : Les acides boroniques provoquent le détachement de la membrane plasmique avec la paroi dans des cultures cellulaires de tabac. **A**. Structure générale d'un acide boronique. **B**. Un décollement de la membrane plasmique, normalement accolée à la paroi est observé après un traitement avec 0,5 mM de bore, 1 h avant plasmolyse des cellules, excepté en certains points d'attachement. **C**. Ces zones d'attachement disparaissent

lors d'un traitement avec 0,5 mM d'acide 3-nitrophénylboronique, 1 h avant plasmolyse. Les flèches indiquent la zone correspondante à l'encadré. pm-cw : point d'attachement membrane plasmique-paroi, pr : protoplaste. Echelle : 50 μ m. D'après Bassil *et al.*, 2004.

- 2 β -désoxy-Kdo

In vitro, le 2 β -désoxy-Kdo bloque l'enzyme KDSB chez *Arabidopsis*, responsable de la formation de CMP-Kdo (Smyth *et al.*, 2013). Lorsque des plantules sont cultivées en présence de cet inhibiteur, la croissance des parties aériennes et, plus fortement, des parties racinaires sont réduites. En effet, les racines sont plus courtes et se caractérisent par de nombreuses cellules différenciées à proximité de l'apex, se traduisant par une densité importante de poils absorbants. L'apport exogène de Kdo, en excès par rapport à la concentration d'inhibiteur présente dans le milieu, ou de bore, permet de restaurer partiellement le phénotype. Ceci sous-entend que le 2 β -désoxy-Kdo réduit la dimérisation du RG-II. Certes, la synthèse préalable de la forme active du Kdo est indispensable à son incorporation dans la structure du RG-II, mais le Kdo est un résidu retrouvé dans la chaîne C, non directement impliqué dans la dimérisation. Une explication possible est que la composition monosaccharidique complexe du RG-II détermine sa structure secondaire, ce qui nécessite une conservation structurale. Une autre explication est que, lors de la synthèse du RG-II, l'addition des chaînes latérales suit un ordre séquentiel, tel que l'inhibition de la synthèse de la chaîne C stoppe la synthèse ou le transfert des autres chaînes sur la chaîne HG (Smyth *et al.*, 2013).

Plusieurs fonctions, déduites de ces études, ont pu être attribuées au RG-II. Ainsi, la conservation de l'architecture du RG-II, c'est-à-dire, sa composition en monosaccharide et sa structure 3D, est nécessaire à sa dimérisation. Ce seraient donc les défauts de dimérisation du RG-II qui provoqueraient des symptômes à différentes échelles sur la plante : l'intégrité du réseau pariétal est touchée en premier lieu provoquant une augmentation de la porosité et des gonflements pariétaux. A l'échelle cellulaire, ceci retentit sur l'élongation et la croissance des cellules et notamment sur les gamètes mâles. Il en découle un affaiblissement des tissus et un port érigé de la plante défectueux.

III. Nos modèles d'étude

1. Le tube pollinique : modèle d'étude de la paroi primaire

La double fécondation chez les Angiospermes requiert le transport des cellules spermatiques par le tube pollinique. Après avoir été déposé sur l'organe femelle compatible, le

pollen germe et forme une protubérance cellulaire. Ce tube pollinique va devoir croître rapidement (1 cm.h^{-1} *in vivo* chez *Arabidopsis*) dans le tissu de transmission femelle pour atteindre les ovules et délivrer les gamètes mâles (Palanivelu & Tsukamoto, 2011). Sa principale activité métabolique consiste en la synthèse golgienne, l'assemblage des polysaccharides pariétaux et leur acheminement vers l'apex du tube par des vésicules de sécrétion où elles fusionnent avec la membrane plasmique de façon coordonnée afin de maintenir une croissance polarisée rapide pour la fécondation du gamétophyte femelle. En conséquence, les gènes les plus fortement exprimés dans le pollen d'*Arabidopsis* sont ceux impliqués dans la biosynthèse et le remodelage de la paroi (Pina *et al.*, 2005 ; Mollet *et al.*, 2013 ; Loraine *et al.*, 2013). Le tube pollinique se présente donc comme un système modèle adapté à l'étude de la biosynthèse et du remodelage de la paroi (Geitmann, 2010). Le caractère haploïde du pollen permet d'observer un phénotype lorsque la mutation d'un gène vital ne permet pas d'obtenir une plante homozygote. Ainsi, l'étude du pollen est très utile dans une approche de génétique inverse, pour attribuer une fonction au gène muté.

Bien que le tube pollinique ne présente pas de paroi secondaire, deux parties sont généralement distinguées, une phase externe constituée principalement de pectines, hémicelluloses et cellulose et une phase interne caractérisée par la présence de callose dans les régions distales du tube (Dardelle *et al.*, 2010 ; Chebli *et al.*, 2012).

a. Les β -glucanes

Contrairement à la majorité des cellules somatiques, la cellulose est peu présente dans la paroi du tube pollinique qui contient préférentiellement de la callose (Mollet *et al.*, 2013). Ce polymère de β -(1 \rightarrow 3)-glucane est présent dans la paroi interne et est absent dans la partie apicale du tube. En effet, les dépôts de callose débutent à une distance de 30 μm de l'apex chez *Nicotiana tabacum* (Ferguson *et al.*, 1998), 20 μm chez *Lilium orientalis* (Fayant *et al.*, 2010) et 10 μm chez *Arabidopsis* (Chebli *et al.*, 2012). Des bouchons de callose sont aussi synthétisés à intervalles réguliers par les callose synthases (Cai *et al.*, 2011) afin de concentrer le cytoplasme contenant les polysaccharides nouvellement synthétisés dans la partie apicale du tube. Les parties plus anciennes du tube sont donc isolées, en arrière du tube, par la présence de ces bouchons (Qin *et al.*, 2012). La forte proportion de callose le long du tube permet le renforcement de la paroi contre les contraintes mécaniques subies lors de la fécondation (Parre et Geitmann, 2005).

b. Les hémicelluloses

Peu d'études ont relaté la présence d'hémicelluloses dans la paroi du tube pollinique. Récemment, des analyses immunocytochimiques menées sur le tube pollinique d'*Arabidopsis* à l'aide d'anticorps dirigés contre les motifs XXXG (LM15) et les XyGs fucosylés (CCRC-M1), ont permis de détecter la présence de XyG uniformément le long de la paroi du tube (Dardelle *et al.*, 2010 ; Chebli *et al.*, 2012). L'étude des fragments de XyG par MALDI-TOF-MS (spectrométrie de masse par désorption/ionisation laser assistée par matrice couplée à un temps de vol) a révélé un profil particulier avec 68% de XyG O-acétylé. (Dardelle *et al.*, 2010). Il est à noter que la nature des hémicelluloses présentes dans la paroi du tube pollinique peut être différente de celle des cellules somatiques pour un organisme donné. En effet, chez la tomate et le tabac, Dardelle *et al.* (2015) ont montré que le XyG des tubes polliniques arborait des motifs fucosylés non retrouvés dans la paroi des cellules somatiques, suggérant un rôle spécifique du fucose dans l'élongation du tube pollinique.

c. Les pectines

Les pectines qui sont exocytées à l'apex sous forme estérifiée, sont les principaux composants de la paroi externe du tube pollinique (Bosch *et al.*, 2005). La plupart des informations concernant la composition en pectines du tube pollinique concernent les HGs. Les immunomarquages ont révélé un profil particulier retrouvé chez la majorité des Angiospermes. Les HGs fortement méthylestérifiés (révélés à l'aide des anticorps JIM7 ou LM20) sont principalement détectés à l'apex du tube tandis que les HGs faiblement méthylestérifiés (reconnus par JIM5 ou LM19) sont retrouvés tout le long du tube pollinique excepté dans la région apicale (Li *et al.*, 1994 ; Jauh & Lord, 1996 ; Wu *et al.*, 2008 ; Dardelle *et al.*, 2010). Chez *Arabidopsis*, la dé-estérification des HGs commence de 3 à 10 μm en arrière du dôme apical impliquant l'activité de PME. Parmi les 66 gènes codant pour des PME putatives chez *Arabidopsis*, 14 sont exprimés spécifiquement dans le grain de pollen ou le tube pollinique (Mollet *et al.*, 2013 ; Leroux *et al.*, 2015). L'analyse des mutants *vanguard1* (Jiang *et al.*, 2005), *Atppme1* (Tian *et al.*, 2006) ou encore *pme48* (Leroux *et al.*, 2015), knock-out pour un gène codant une PME, a montré le rôle critique de ces enzymes dans la croissance du tube. Bien que peu de PME spécifiques du pollen aient été fonctionnellement caractérisées, leur action modérée par les PMEIs, contrôle la plasticité dans la partie apicale du tube. Une mutation portée par le gène At5g55590, codant une protéine à activité PME, affecte la dégradation des pectines des microspores issues de la méiose. Ainsi, les parois externes des microspores sont fusionnées

et les grains de pollen de ce mutant sont libérés sous forme de tétrades, d'où son nom *quartet* (Rhee & Somerville, 1998).

Les chaînes latérales du RG-I ont également été détectées dans la paroi du tube pollinique, en particulier des chaînes d'arabinanes identifiées par immunomarquage grâce à l'utilisation des anticorps LM6 et LM13. Une étude à l'échelle de la microscopie électronique a permis de les localiser plus précisément dans la paroi externe chez *Arabidopsis*, en accord avec la localisation des autres composés pectiques (Dardelle *et al.*, 2010 ; Lehner *et al.*, 2010).

Concernant le RG-II, sa faible proportion dans la paroi a rendu difficile sa localisation dans le tube pollinique. Matoh *et al.*, (1998) ont développé un anticorps polyclonal dirigé contre le complexe borate-RG-II et le monomère de RG-II qui a permis de détecter la présence de RG-II le long de la paroi du tube pollinique de *Lilium longiflorum*. De plus, l'altération de l'expression de gènes impliqués dans la biosynthèse du RG-II entraîne un défaut de croissance du tube pollinique, comme l'ont montré les études de mutants chez *Arabidopsis* (Delmas *et al.*, 2008; Deng *et al.*, 2010; Kobayashi *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2011).

d. Les glycoprotéines

Les données de transcriptomique (Wang *et al.*, 2008) ont révélé une forte expression des gènes codant spécifiquement pour des AGPs dans le tube pollinique dont 4 sont exprimées uniquement dans le pollen (AGP6, AGP11, AGP23 et AGP40) (Nguema-Ona *et al.*, 2012). La double mutation *agp6/agp11* affecte le développement du gamétophyte mâle entraînant une forte baisse de la fécondité (Coimbra *et al.*, 2009). La localisation et le rôle des AGPs dans la croissance du tube pollinique ont été effectuées à l'aide du réactif de β -glucosyl-Yariv ainsi que d'anticorps monoclonaux. Les immunomarquages ont révélé la présence des AGPs dans la zone d'émergence du tube et tout le long de la paroi (Pereira *et al.*, 2006 ; Dardelle *et al.*, 2010). Néanmoins, dans ces différentes études immunocytochimiques, le profil de distribution des épitopes associées aux AGPs varie selon l'anticorps utilisé et selon l'espèce étudiée, traduisant la diversité de ces glycoprotéines (Nguema-Ona *et al.*, 2012). Un traitement au Yariv des tubes polliniques de lys va inhiber de façon réversible leur croissance. Lorsque le Yariv est retiré du milieu un nouveau tube pollinique émerge alors plus en arrière (Mollet *et al.*, 2002). La sécrétion localisée d'AGPs permet de prédire le nouveau site d'émergence. Ces données suggèrent que les AGPs pourraient avoir un rôle dans la polarisation et l'élongation du tube pollinique. Outre leurs implications dans la croissance du tube pollinique, certaines AGPs

constitueraient un signal pour l'attraction du tube vers les parties femelles (Coimbra *et al.*, 2007).

La paroi des tubes polliniques contiendraient également des extensines. La protéine pollen spécifique PEX1 (POLLEN EXTENSIN-LIKE 1) riche en motifs extensines Ser(Hyp)₄ (Rubinstein *et al.*, 1995) a été localisée dans la paroi interne du tube pollinique de maïs, avec la callose. La fonction exacte de cette protéine n'a pas été élucidée, mais son implication dans la croissance du tube pollinique a fortement été suggérée.

e. Calcium et bore

Le calcium et le bore sont essentiels à la croissance du tube pollinique mais en quoi ces minéraux sont-ils importants dans l'architecture de la paroi du tube? Depuis une cinquantaine d'années, il est reconnu que la présence de calcium dans le milieu de germination est nécessaire à la croissance du tube pollinique *in vitro* (Brewbaker & Kwack, 1963). Il serait localisé dans la paroi du tube et non dans le cytoplasme, comme il a pu être observé par autoradiographie en utilisant du ⁴⁵Ca²⁺ (Kwack, 1967). Ceci est en accord avec l'interaction connue du calcium et des pectines pariétales assurant le maintien de l'intégrité cellulaire. Le Ca²⁺ intracellulaire forme un gradient partant de l'apex et sa concentration doit être supérieure à celle du milieu extracellulaire et supérieure à 10 µM pour empêcher l'éclatement du tube. Il a d'ailleurs longtemps été admis que la croissance oscillatoire polarisée du tube pollinique était maintenue et dirigée par la périodicité des influx de Ca²⁺ extracellulaires grâce à des canaux actifs présents à l'apex (Lee *et al.*, 2008), mais ces deux événements ne seraient pas en phase (McKenna *et al.*, 2009). Néanmoins, de par son rôle de messenger intracellulaire et celui d'élément de structuration de la paroi, le calcium a une place primordiale dans la croissance polarisée du tube pollinique.

Le rôle du bore dans la paroi du tube est similaire à celui du calcium pour les propriétés mécaniques de la paroi au niveau de l'apex. Sous sa forme ionisée, il permet la dimérisation du RG-II nécessaire à la structuration de la paroi. Sa concentration optimale doit être suffisante pour assurer la rigidité de la paroi et empêcher l'éclatement sous l'effet de la pression de turgescence mais assez faible pour permettre l'élongation lors des périodes de croissance accélérée (Holdaway-Clarke *et al.*, 2003). Dans un milieu déficient en bore, la distribution des polysaccharides pariétaux va être modifiée à l'apex des tubes polliniques de *Picea meyeri* (Wang *et al.*, 2003) avec une forte accumulation de callose et de pectines dé-méthylestérifiées.

Ceci augmenterait la force de tension du tube dans la zone apicale et diminuerait son extensibilité par accumulation d'ions calciques.

La **figure 26** représente la sécrétion, l'assemblage et le remodelage des principaux composants pariétaux à l'apex et la région sub-apicale du tube pollinique. Sur cette figure, les AGPs ne sont pas représentées par soucis de clarté, leur distribution analysée par immunocytochimie étant très variable d'une espèce à l'autre.

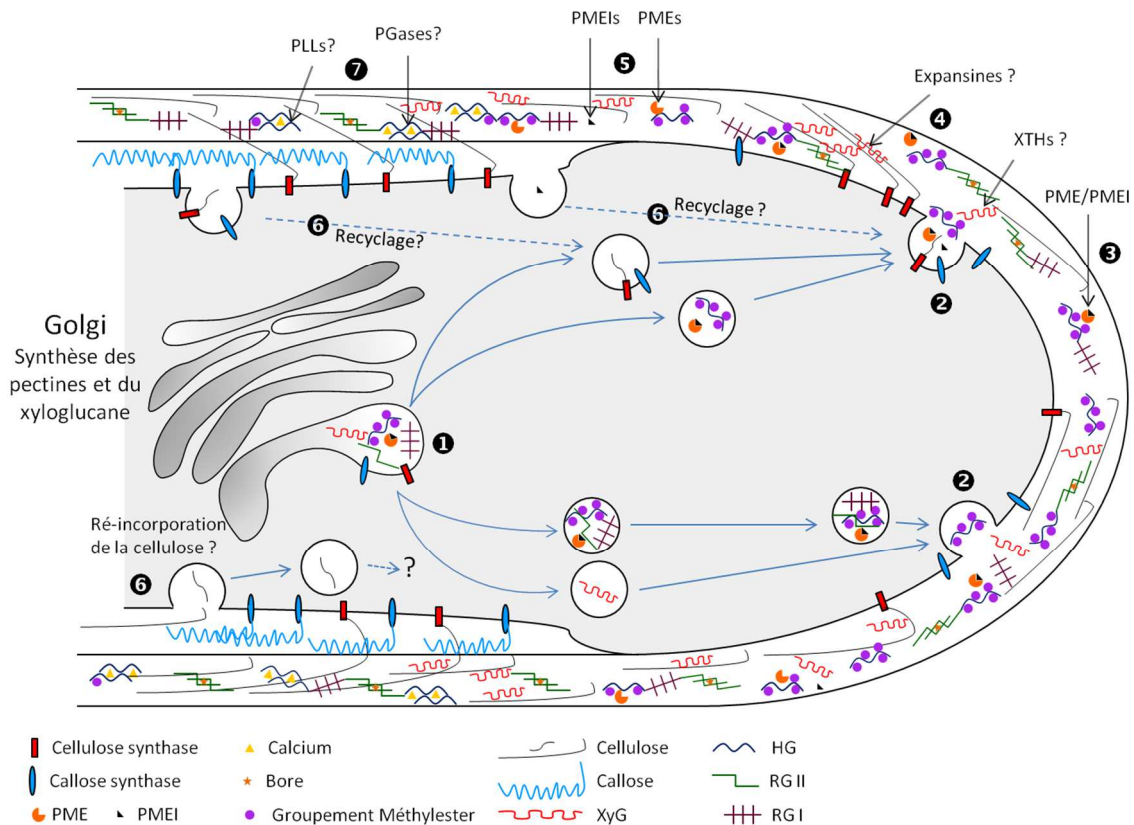


Figure 26 : Modèle de sécrétion et d'assemblage des principaux composants de la paroi du tube pollinique. (1) Les callose et cellulose synthases ainsi que le XyG et les pectines (HG, RG-I and RG-II) sont transportés par les vésicules dérivées de l'appareil de Golgi. Les HGs sont synthétisés sous forme hautement méthylestérifiée et peuvent être transportés avec les complexes PME/PMEI. D'après Chormova *et al.* 2014a, le dimère de RG-II serait formé dans ces vésicules, avant sa sécrétion dans la paroi. (2) Les vésicules se dirigent vers la membrane plasmique dans la partie sub-apicale du tube pollinique où elles fusionnent et relarguent leurs contenus (polysaccharides et/ou protéines) dans la paroi. Les enzymes callose et cellulose synthases demeurent ancrées à la membrane alors que les complexes PME/PMEI et les autres enzymes de remodelage de la paroi sont relarguées dans l'apoplaste (3). (4) Le XyG et les microfibrilles de cellulose interviennent probablement dans le relâchement pariétal, facilité par les XTH et les expansines. (5) Les PMEs sont activées après leurs séparations d'avec les PMEIs. Les PMEs dé-méthylestérifient les HGs ce qui permet la fixation des ions calcium entre plusieurs chaînes d'HGs parallèles, renforçant la rigidité de la paroi cellulaire. (6) Il est supposé que les PMEIs ainsi que l'excès de cellulose et de callose synthases soient recyclés par endocytose. (7) Les PGases et les PLLs sont potentiellement impliquées dans le remodelage de la paroi du tube. PGs : polygalacturonases ; PLLs, pectates lyases-like ; PMEs : pectines méthylestérases ; PMEIs : inhibiteurs de pectine méthylestérase ; RG-I, rhamnogalacturonane de type I ; RG-II, rhamnogalacturonane de type II ; XTH, xyloglucane *endo*-transglucosidases/hydrolases ; XyG, xyloglucane. Le schéma n'est pas représenté à l'échelle. D'après Mollet *et al.*, 2013.

2. La racine d'*Arabidopsis thaliana* : un modèle pour l'étude de la croissance cellulaire.

a. Rôles et architecture de la racine

La racine est un organe souterrain qui endosse plusieurs rôles pour la plante. Elle assure son ancrage dans le sol et garantit sa nutrition en puisant l'eau et les éléments qu'elle ne peut synthétiser. La racine est également un site d'interactions avec les microorganismes situés dans la rhizosphère, qui peuvent être pathogènes pour la plante mais aussi bénéfiques (Desbrosses & Stougaard, 2011 ; Bakker *et al.*, 2013).

Cet organe s'organise en trois zones distinctes (Dolan *et al.*, 1993 ; Petricka *et al.*, 2012). La zone méristématique, qui constitue les premiers 250 μm de la partie distale de la racine est le siège de la division et de la prolifération cellulaire et se caractérisent par des cellules de petite taille. Dans la zone adjacente, zone d'élongation, les cellules vont s'allonger et atteindre leurs tailles quasi-finales. Puis les cellules vont se différencier dans la dernière zone, la plus distale, en fonction des tissus auxquels elles appartiennent. Certaines cellules épidermiques, appelées alors trichoblastes, vont développer des bourgeonnements qui évolueront en poils absorbants. (**Fig. 27**).

Une fois l'architecture de la racine primaire établie, des racines latérales peuvent émerger au niveau de la zone de différenciation et forment des ramifications. Ces racines secondaires sont issues d'un tissu situé en profondeur, le péri-cycle, dont les cellules vont être stimulées pour entrer en division (Péret *et al.*, 2009) (**Fig. 27**).

Des racines supplémentaires, appelées racines adventives, peuvent apparaître au niveau des organes aériens naturellement ou en réponse à un stress biotique ou abiotique (Li *et al.*, 2009). Leur formation est similaire à celles des racines latérales (Ermel *et al.* 2000), et implique un processus de dédifférenciation des cellules afin de former un primordium racinaire, mais les facteurs génétiques, hormonaux et environnementaux qui régulent leur apparition les distinguent des racines latérales (Verstraeten *et al.*, 2014).

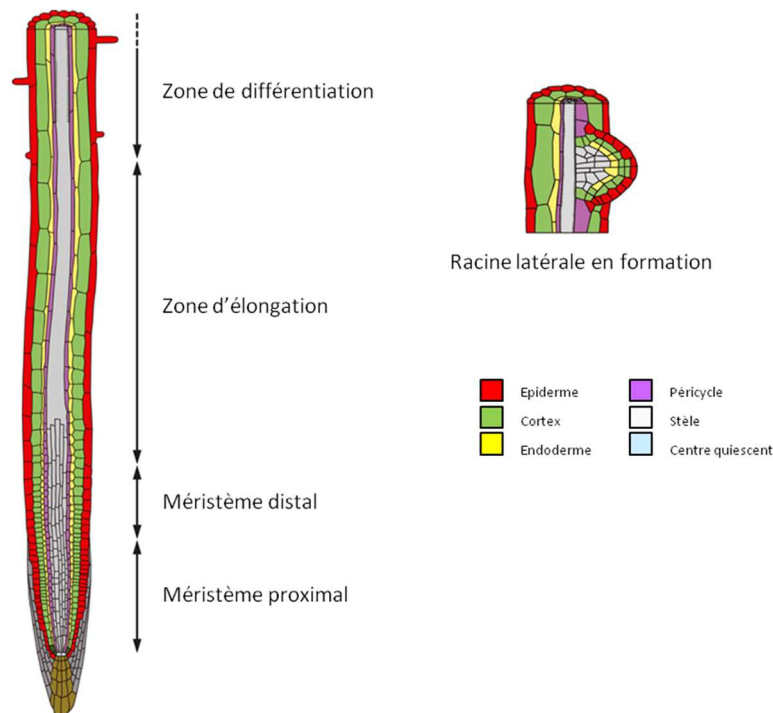


Figure 27 : Organisation tissulaire de la racine d'*Arabidopsis*. L'épiderme (en rouge), le cortex (en vert), l'endoderme (en jaune) et le péricycle (en violet) sont chacun formés d'une monocouche de cellules et entourent les tissus conducteurs de la stèle (en gris). Les tissus les plus externes sont organisés en cylindres concentriques. Leurs cellules sont issues des cellules initiales situées près du centre quiescent (en bleu clair) puis transitent à travers les méristèmes proximal et distal durant la phase de division. Elles subissent ensuite une croissance rapide dans la zone d'élongation avant d'entrer en zone de différenciation. Les racines latérales sont issues d'un autre tissu, le péricycle, où les cellules vont se différencier pour reformer un méristème et donner naissance à une racine secondaire. D'après Benfey *et al.*, 2010.

L'architecture racinaire est très contrôlée par les hormones telles que l'auxine, qui est sans nul doute la plus importante dans le développement de la racine (Overvoorde *et al.*, 2010), les cytokinines, l'acide gibbérellique ou encore l'éthylène (Petricka *et al.*, 2012). En réponse aux facteurs environnementaux, le système racinaire peut évoluer. La racine perçoit la disponibilité en nutriments du sol (tels que les nitrates, phosphates, sulfates, fer...) grâce à des systèmes senseurs qui vont déclencher des cascades de transduction spécifiques (Beekman & Friml, 2010). Ainsi, la croissance de la racine primaire, la formation des poils absorbants, des racines latérales et adventives vont être modulées pour développer un réseau qui compense le manque de mobilité de la plante (López-Bucio *et al.*, 2003). Ces changements architecturaux impliquent des ajustements synergiques de la synthèse et du transport des différentes phytohormones.

b. Un modèle pour l'étude de la croissance cellulaire

La racine d'*Arabidopsis* est reconnue depuis longtemps comme un modèle intéressant pour étudier la croissance cellulaire. Son ontogenèse est peu variable et l'organisation cellulaire est très contrôlée. La relative simplicité de réaliser une analyse génétique a permis de définir avec précision le profil génétique des différents types cellulaires en fonction du stade de développement de l'organe et en réponse à différents stimuli. Cette caractérisation très détaillée a propulsé la racine au premier rang des modèles pour l'étude développementale de la plante.

Comme il a été décrit précédemment, cet organe réagit aux conditions environnementales en modifiant sa croissance qui se traduit par un changement phénotypique facilement identifiable. La fonction de nombreux gènes a ainsi pu être déterminée grâce à des criblages de mutants présentant des défauts de croissance racinaire (Benfey *et al.*, 1993), qu'il s'agisse de mutant affecté dans le cycle cellulaire (Nezames *et al.*, 2012), dans la perception d'hormones (Clouse *et al.*, 1996) ou encore dans la synthèse de composés pariétaux (Desnos *et al.*, 1996 ; Fagard *et al.*, 2000).

Puisque la croissance cellulaire est liée à un remaniement de la paroi, nous nous sommes aussi intéressés à ce modèle pour développer des approches d'étude du lien qui existe entre le RG-II et la croissance cellulaire.

IV. Approches alternatives.

Nous avons évoqué en préambule notre volonté de développer des alternatives aux méthodes usuelles d'étude de polysaccharides pariétaux, que sont la génétique fonctionnelle et l'imagerie par immunocytochimie, applicables au RG-II. Ce dernier chapitre introductif est dédié à l'état de l'art concernant la méthode de « click chemistry » et l'utilisation d'inhibiteurs en glycobiologie.

1. Le marquage métabolique de glucides par « click chemistry » : vers une alternative à l'utilisation d'anticorps ?

a. Principe de la « click-chemistry »

La « click chemistry » est un terme introduit par Sharpless en 2001 pour désigner des réactions chimiques répondant à plusieurs critères précis (**Fig. 28**) (Kolb *et al.*, 2001).



Figure 28 : Critères régissant une réaction de « click chemistry »

Plusieurs classes de transformations chimiques sont considérées comme réactions dites de « click chemistry » mais la « crème de la crème » est une réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen (Huisgen *et al.*, 1984) entre un groupement azoture et un groupement alcyne, catalysée par le cuivre. Celle-ci répond aux critères d'efficacité, de simplicité et de rapidité (Rostovtsev *et al.*, 2002) (**Fig. 29**). Très tolérante en terme de conditions expérimentales, elle peut s'effectuer à une large gamme de température, de pH 4 à 12, et est compatible avec une utilisation en conditions aqueuses, ce qui permet son application en milieux biologiques. La catalyse par le cuivre permet d'accélérer la réaction de 10^7 à 10^8 fois. Ainsi, biologistes, organiciens ou encore chimistes des matériaux concentrent leurs dernières recherches sur ce type de réaction.

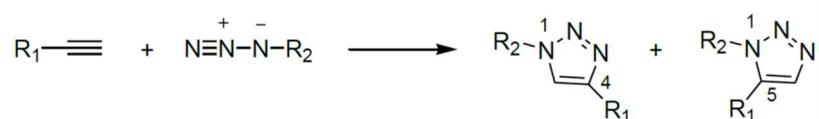


Figure 29 : Mécanisme de la cycloaddition de Huisgen entre un alcyne et un azoture.

b. La « click chemistry » appliquée à la biologie.

Intéressons-nous plus en détails à la biologie, où la « click chemistry » a su trouver de nombreuses applications sur une variété d'organismes. Cette réaction peut être notamment utilisée dans l'assemblage de médicaments à des anticorps, elle permet également de sonder une activité enzymatique dans des cultures cellulaires (Speers & Cravatt, 2004), de tracer des éléments en imagerie médicale (Zeng *et al.*, 2013) ou encore de visualiser des biomolécules

dans des cellules fixées (Best, 2009 ; Zimmerman *et al.*, 2014). Les analogues azides et alcynes sont les dérivés chimiques les plus utilisés grâce à leurs petites tailles, leurs stabilités métaboliques, et l'absence d'effets négatifs sur les fonctions physiologiques. Ils sont métaboliquement incorporés dans les glycoconjugués, glycannes, lipides et protéines dans les cellules vivantes, voire chez des animaux vivants (Prescher *et al.*, 2004 ; Prescher & Bertozzi 2005) et vont réagir avec un fluorophore-azide ou -alcyne permettant leur localisation. Cette technique est d'autant plus intéressante qu'elle permet la visualisation des protéines ou lipides sans aucune modification génétique (Hao *et al.*, 2011). Ainsi, elle a permis l'étude de la surface de cellules bactériennes comme *Escherichia coli* et *Legionella pneumophila* (Link & Tirrel, 2003 ; Link *et al.*, 2004 ; Dumont *et al.*, 2012 ; Mas Pons *et al.*, 2014) ou encore des cellules de mammifères (Boyce & Bertozzi, 2011 ; Hong *et al.*, 2010).

Cependant, la catalyse par les ions cuivre est problématique dans le cas des applications *in vivo* puisqu'à partir d'un certain seuil de tolérance, le cuivre devient toxique pour les cellules, ce qui ne permet pas de conserver les organismes vivants après la réaction. Ainsi, certaines stratégies alternatives se développent et visent à s'affranchir du catalyseur cuivrique tout en conservant l'efficacité de la réaction. Ces méthodes ne cherchent pas à substituer le cuivre par un autre catalyseur mais plutôt à modifier les composés de la réaction. Par exemple, l'ajout d'une difluorocyclooctyne (DIFO) ou d'une dibenzocyclooctyne (DIBO) greffée au fluorophore, adjacente à la fonction alcyne, permet d'augmenter considérablement la vitesse de la cycloaddition avec des groupements azoture par rapport à des cyclooctynes simples (Ess *et al.*, 2008 ; Bach, 2009) (**Fig. 30**). La sonde DIFO constitue un substituant électro-attracteur tandis que la sonde DIBO agit en augmentant la tension de cycle induite par l'addition des cycles aromatiques. Ces sondes ont permis de visualiser des glycannes *in vivo*, d'étudier leurs biosynthèses et la dynamique de leurs turnovers chez le poisson zèbre (*Danio rerio*) (Baskin *et al.*, 2007 ; Laughlin *et al.*, 2008 ; Dehnert *et al.*, 2012), le nématode *Caenorhabditis elegans* (Laughlin & Bertozzi, 2009) ou encore chez la souris (Neves *et al.*, 2013).

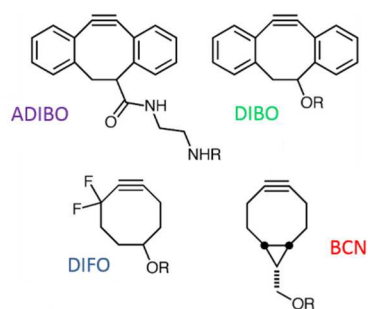


Figure 30 : Structures de cyclooctynes utilisées en « click chemistry ». ADIBO : Azadibenzylcyclooctyne ; BCN : Bicyclo[6.1.0]nonyne ; DIBO : Dibenzocyclooctyne ; DIFO : Difluorocyclooctyne.

c. Et chez les organismes végétaux ?

Cette approche qui paraît si simple ne semble pas pour autant avoir été beaucoup appliquée chez les plantes, puisque très peu de données ont été publiées. Kaschani *et al.*, l'ont utilisée en 2009 pour identifier les cibles d'un inhibiteur de protéase sur des tissus vivants. Mais Anderson *et al.* furent les pionniers de la « click chemistry » catalysée par le cuivre appliquée à la paroi cellulaire végétale (Anderson *et al.*, 2012 ; Wallace *et al.*, 2012 ; Anderson & Wallace, 2012). Ils ont montré qu'un analogue du fucose, le fucose-alcyne (Fuc-Al), est métaboliquement incorporé dans les cellules racinaires d'*Arabidopsis* et peut ensuite être « clické » à un fluorophore de type Alexa-azide (**Fig. 31**). L'analyse biochimique de la paroi a révélé que le Fuc-Al est concentré dans la fraction pectique et en particulier dans le RG-I. Ainsi, il est possible de suivre la localisation et la dynamique du RG-I au cours de la croissance de la racine au niveau pariétal et à plus forte raison, les pectines. Cependant, le Fuc-Al ne mimerait pas parfaitement le L-Fuc *in planta* puisqu'aucune diminution de la fluorescence n'a été détectée chez des plantules affectées dans la synthèse de FucTs spécifiques du XyG, des AGPs ou encore des glycoprotéines, suggérant une différence d'affinité des FucTs envers le GDP-L-Fuc et le GDP-L-Fuc-alcyne.

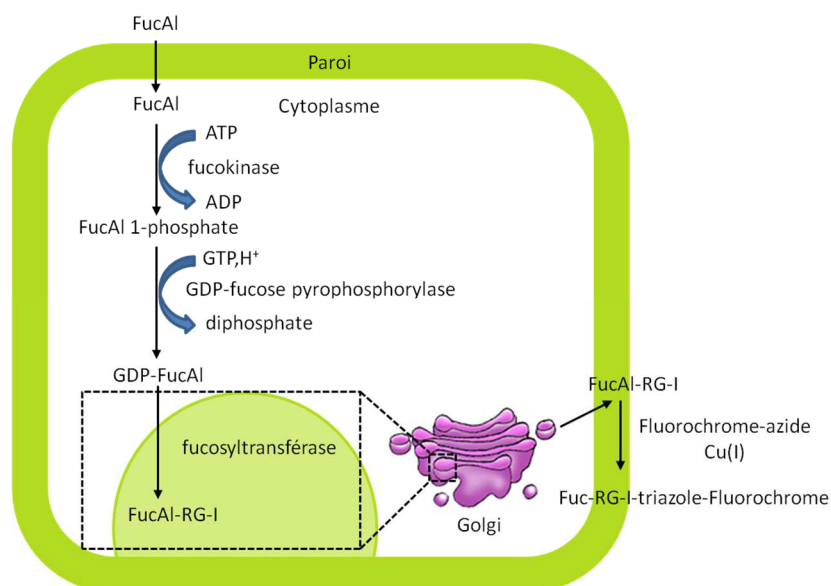


Figure 31 : Modèle illustrant l'incorporation du Fuc-AI dans les cellules végétales. Le Fuc-AI extracellulaire (peracétylé) est incorporé dans la cellule puis désacétylé. Le Fuc-AI entre ensuite dans la voie métabolique de “recyclage” où il est converti en Fuc-AI 1-phosphate et en GDP-Fuc-AI par l'enzyme bifonctionnelle L-FUCOKINASE/GDP-L-FUCOSE PYROPHOSPHORYLASE. Le GDP-Fuc-AI est ensuite transféré sur le RG-I dans l'appareil de Golgi par une FucT non encore identifiée. Le RG-I contenant du Fuc-AI est sécrété vers la paroi et peut être visualisé en présence de Cu(I) par un fluorochrome-azide. D'après Anderson & Wallace, 2012.

Mais une étude *in vivo* n'est pas compatible avec l'emploi de monosaccharides-alcynes qui nécessite une catalyse par le cuivre pour la réaction avec le fluorochrome, contrairement aux dérivés azides.

Plus récemment utilisés pour visualiser le processus de lignification, des monolignols métabolisables (alcool coniférylique-azide) ont été incorporés dans les lignines puis marqués par une réaction de « copper-free click chemistry » par réaction avec une sonde couplée à une cyclooctyne de type BCN. Cette étude réalisée sur des coupes de tige et des plantules d'*Arabidopsis* (Tobimatsu *et al.*, 2014) est la première réalisée *in vivo* chez les plantes. Cependant, l'analyse du couplage par RMN a révélé une quantité importante de fluorochrome non couplé, expliquant un faible marquage par rapport à la réaction catalysée par le cuivre.

Bourge *et al.*, (2015) ont adapté les paramètres de la « click chemistry » afin de permettre sa compatibilité avec l'observation d'une protéine fluorescente dans des cellules *Nicotiana tabacum* L. cv Bright Yellow -2 (BY-2). La première étape consiste à sélectionner les cellules en phase G1 du cycle cellulaire après incorporation d'un analogue de la thymidine (le 5-éthynyl-

2'-désoxyuridine), dans l'ADN en cours de réplication, suivi de son couplage à un fluorochrome. Mais le cuivre, catalyseur de la « click chemistry », quenche les protéines fluorescentes. Une chélation du cuivre est donc nécessaire avant de pouvoir visualiser la synthèse de la membrane golgienne grâce à l'expression d'une protéine fluorescente.

2. Les inhibiteurs de voies glucidiques

a. Les sucres désoxy

Les sucres désoxy peuvent être utilisés comme des inhibiteurs putatifs de synthèse de polysaccharides. La stratégie consiste à supprimer ou modifier le groupement hydroxyle impliqué dans la liaison glycosidique (Edmonds & Peddie, 2006). Les sucres désoxy peuvent également perturber des voies cytosoliques du métabolisme glucidique. Entre autre, le désoxyglucose (dGlc) est un analogue du glucose étudié depuis longtemps pour son rôle d'inhibiteur de la synthèse de divers glycannes et de la glycosylation des protéines chez plusieurs organismes (Datema *et al.*, 1983). Le dGlc est métabolisé dans différents tissus pour former l'UDP-dGlc et le GDP-dGlc. Ce sont ces formes activées du Glc qui seraient responsables de l'action inhibitrice plutôt que le dGlc libre. L'utilisation du 2-dGlc comme analogue du Glc chez l'algue *Prototheca zopfii* inhibe la synthèse de β -(1→4)-glucanes, en bloquant l'initiation des chaînes (Datema *et al.*, 1983). Chez les plantes, le 2-dGlc peut être phosphorylé dans le cytosol par une hexokinase et son accumulation dans le cytosol exerce des effets toxiques sur les cellules par compétition avec le glucose-6-P, tels que la répression des gènes de la photosynthèse (Jang & Sheen, 1994) ou l'inhibition de la réponse gravitropique (Jaffe & Leopold, 1984). Le gène de résistance au 2-dGlc est d'ailleurs utilisé comme alternative aux antibiotiques et aux herbicides, pour la sélection de plantes transformées (Kunze *et al.*, 2001). Les effets du 2 β -désoxy-Kdo décrits dans la partie précédente illustrent bien le pouvoir des sucres désoxy dans l'identification du rôle du RG-II dans la croissance racinaire.

b. Les sucres fluorés

Le fluor est un atome fortement électronégatif qui possède un faible rayon atomique. En effet, c'est le plus petit atome pouvant substituer un atome d'H dans une liaison C—H sans perturber la reconnaissance de la molécule par les enzymes telles que les GTs. L'introduction de l'atome de fluor à proximité du carbone anomérique déstabilise l'état de transition adopté par le substrat naturel (**Fig. 32**)

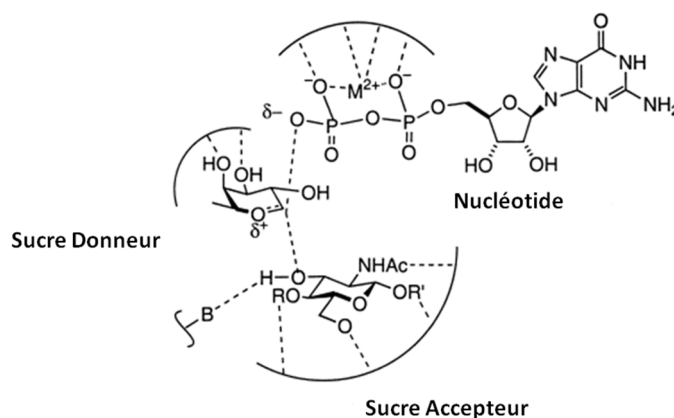


Figure 32 : Structure putative de l'état de transition adopté par le substrat des FucTs de mammifère. Le fucose serait à l'état d'ion oxocarbenium. La présence d'un atome de fluor dans la structure déstabiliserait cet état de transition. D'après Burkart *et al.*, 2000.

Ainsi, ces molécules fluorées forment un complexe covalent stable avec le site actif des GTs qu'elles inhibent (Burkart *et al.*, 2000). L'accumulation de l'inhibiteur dans la cellule bloquerait également la synthèse *de novo* du substrat naturel (**Fig. 33**) comme l'a décrit Rillahan *et al.* en 2012 sur des analogues du fucose et d'acide sialique, inhibiteurs de la fucosylation et de la sialylation, respectivement, chez les mammifères. Bien que l'introduction d'un atome de fluor dans la structure d'une molécule augmente ses propriétés lipophiles (Edmonds & Peddie, 2006), certains composés nécessitent d'être peracétylés afin de traverser efficacement les membranes cellulaires et être incorporés dans la cellule.

Mais quelles applications peut-on trouver chez les plantes ? Le remplacement du groupement hydroxyle en C₁ du fructose d'une molécule de saccharose par un atome de fluor (Hitz *et al.*, 1985) n'inhibe ni sa reconnaissance, ni son transport par un transporteur du saccharose. Cependant, son hydrolyse par l'invertase est réduite. Or, dans certains tissus, l'hydrolyse du saccharose est requise pour activer l'incorporation d'hexoses. Il constitue également un inhibiteur compétitif de l'incorporation du saccharose. L'utilisation du 1'-fluorosaccharose permet d'étudier les contributions relatives des enzymes saccharose synthase et saccharose invertase dans le métabolisme du saccharose de différents tissus.

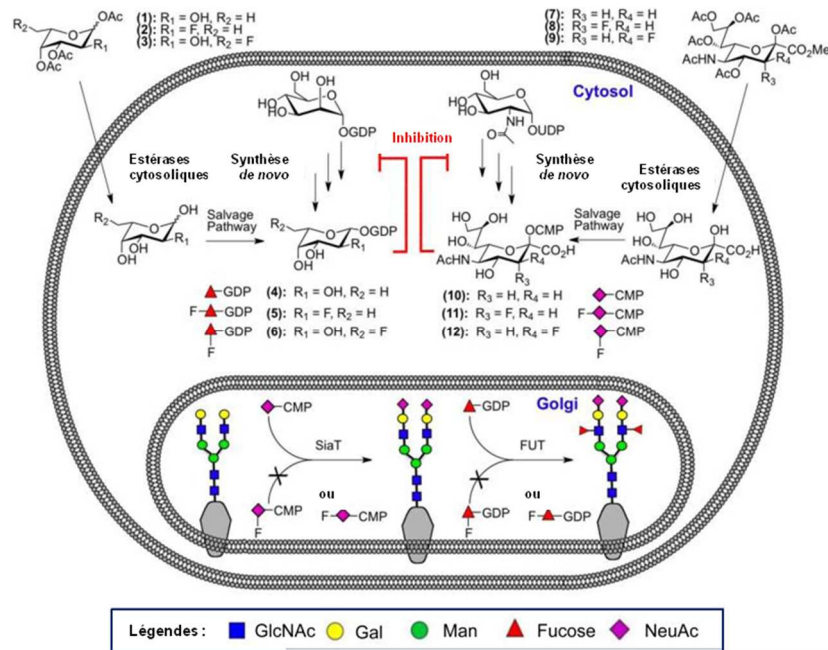


Figure 33 : Les sucres fluorés agissent en tant qu'inhibiteurs des glycosyltransférases. Les analogues fluorés peracétylés du fucose (1-3) ou de l'acide sialique (7-9) sont incorporés dans les cellules et sont convertis en nucléotide-sucres (4-6) et (10-12) par la voie du "salvage pathway". Les analogues fluorés (5-6) et (11-12) inhibent les FucTs et SiaTs correspondantes, et sont accumulés dans la cellule à défaut d'être transférés. Cette accumulation inhibe la synthèse *de novo* du GDP-Fucose (4) ou de l'acide *N*-acétylneuraminique activée sous forme CMP (10) par rétrocontrôle, et diminue l'expression du fucose et de l'acide sialique à la surface de la cellule. GlcNAc : acide *N*-acétylglucosamine ; Gal : galactose ; Man : mannose ; NeuAc : acide *N*-acétylneuraminique. D'après Rillahan *et al.*, 2012.

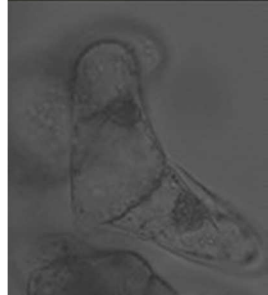
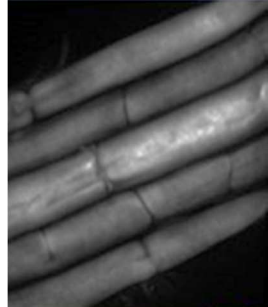
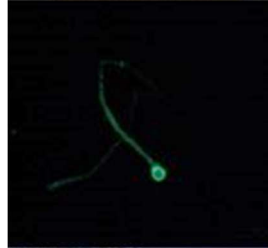
Depuis longtemps utilisée en imagerie médicale, le 2-fluoro-glucose radioactif a été utilisé comme traceur pour suivre le transit en temps réel des photoassimilats chez la plante vivante (Hattori *et al.*, 2008) en condition normale ou de stress (Ferrieri *et al.*, 2012).

Concernant l'application des sucres fluorés sur les plantes en vue d'inhiber une ou plusieurs GTs, aucune étude n'a été reportée. Pourtant, cette méthode novatrice apparaît être une alternative intéressante pour l'inactivation de GTs impliquées dans la synthèse de polysaccharide pariétaux, pour lesquelles aucun mutant homozygote viable n'est disponible.

V. Objectifs de travail

Cette étude bibliographique révèle un rôle important de chaque constituant pariétal dans la croissance et l'élongation cellulaire. Parmi eux, nous nous sommes focalisés sur un polysaccharide particulier et complexe : le RG-II, faisant l'objet d'une thématique à part entière au laboratoire. Découvert depuis peu, sa structure a été caractérisée mais les enzymes responsables de sa synthèse golgienne n'ont pas été identifiées. Par ailleurs, les outils traditionnels d'étude de la paroi ne sont pas toujours adaptés. Ainsi, les objectifs de travail de ma thèse ont été :

- 1- D'analyser l'effet de la mutation d'une sialyltransférase-like fortement pressentie pour coder une Kdo et/ou Dha transférase spécifique au RG-II, en se basant sur le tube pollinique comme modèle d'étude.
- 2- De développer la méthode de « click chemistry » appliquée au RG-II pour sa localisation.
- 3- D'étudier l'effet de sucres fluorés sur l'élongation cellulaire. Ces analogues sont utilisés en tant qu'inhibiteur de la synthèse du RG-II.



II-RESULTATS

Article 1. Rôle du rhamnogalacturonane de type II dans l'élongation du tube pollinique : implication d'une sialyltransférase-like putative.

Dumont M, Lehner A, Bouton S, Kiefer-Meyer MC, Voxeur A, Pelloux J, Lerouge P, Mollet JC. 2014. The cell wall pectic polymer rhamnogalacturonan-II is required for proper pollen tube elongation: implications of a putative sialyltransferase-like protein. *Ann Bot.* **114**(6):1177-1188.

Le rhamnogalacturonane de type II (RG-II) présente une structure complexe, fortement conservée au cours de l'évolution, qui nécessiterait l'intervention d'une vingtaine de glycosyltransférases (GTs) pour sa synthèse. Mais à ce jour, seule une XylT spécifique du RG-II, retrouvée sous quatre isoformes (RGXT1-4) chez *Arabidopsis*, a été caractérisée biochimiquement (Liu *et al.*, 2011) comme étant responsable du transfert du résidu xylose de la chaîne A du RG-II. L'étude bioinformatique menée par Voxeur *et al* (2012), alliant biologie structurale et analyses de coexpression, a permis de sélectionner 26 gènes candidats chez *Arabidopsis* codant potentiellement pour des GTs spécifiques du RG-II. Parmi celles-ci, deux gènes (At1g08660 et At3g48820) appartenant à la famille CAZy GT29 sont pressentis pour coder des enzymes apparentées aux sialyltransférases. Focaliser notre étude sur ces gènes s'explique par la présence de deux sucres, le Dha et le Kdo, uniquement retrouvés dans la structure du RG-II chez les plantes, avec une structure proche de celle de l'acide sialique. Ainsi, ces gènes codent pour des protéines, localisées au niveau du Golgi (Dunkley *et al.*, 2006 ; Daskalova *et al.*, 2009), qui seraient responsables du transfert du Dha et/ou du Kdo pour la synthèse du RG-II. Deng *et al.* (2010) ont étudié la croissance du tube pollinique chez des plantes d'*Arabidopsis* mutées au niveau du gène At1g08660. Les mutants hétérozygotes (*mgp2-1/+*, *sia-1+/-*) ont révélé une altération de la croissance du tube pollinique, que ce soit *in vitro* ou *in vivo*, témoignant d'un défaut d'élongation cellulaire provoquée par la mutation. L'article qui suit, débute par une revue des connaissances concernant le rôle du RG-II dans l'élongation du tube pollinique. La présence de ce polysaccharide pectique dans le tube pollinique d'*Arabidopsis*, de la tomate et du tabac est démontrée par immunohistochimie grâce à l'anticorps développé par Matoh *et al.* (1998) et supportée par une analyse biochimique. Nous nous sommes penchés également sur la caractérisation de mutants affectés dans l'expression du second gène, At3g48820 (*SIA2*), codant pour une Dha et/ou une Kdo transférase putative. Par

une approche similaire à celle utilisée par Deng *et al.* (2010), nous avons pu observer que la mutation affectait la croissance du gamète mâle. Par conséquent, aucune plante homozygote mutante n'a pu être obtenue par autofécondation de plantes mutantes hétérozygotes. Deux lignées hétérozygotes mutantes (*sia2-1+/-* et *qrt1xsia2-2+/-*) ont été étudiées en parallèle. Les grains de pollen issus des deux lignées ont un retard de croissance et comptent un nombre important de tubes polliniques éclatés, courts ou de forme anormale empêchant leurs progressions dans le tissu femelle et la transmission de la mutation à la descendance. La lignée *qrt1xsia2-2+/-*, grâce au fond génétique *quartet*, possède des grains de pollen organisés en tétrade. De plus, l'ADN-T contient un gène rapporteur GUS (β -glucuronidase) qui nous permet de discriminer, après une coloration GUS, les grains de pollen mutants des grains de pollen sauvages pour une approche *in vivo*. Ainsi, nous avons observé que lorsque les tubes polliniques sauvages ont atteint les ovules, la croissance des tubes polliniques mutants est quant à elle restreinte au style.

L'intégrité de la paroi du tube pollinique est nécessaire pour sa croissance. Une mutation affectant la synthèse ou la structure d'un polysaccharide constitutif de la paroi, entraîne une désorganisation du réseau pariétal et affecte l'élongation du tube pollinique. Cette étude a permis d'attester de la présence du RG-II dans la paroi du tube pollinique, de souligner l'importance de la conservation structurale du RG-II pour sa croissance et de contribuer à la caractérisation de GTs spécifiques du RG-II.

Résultats complémentaires : complémentation pollen-spécifique par Floral dip

Afin d'attribuer avec certitude le phénotype du pollen *qrt1xsia2-2+/-* à la mutation du gène *SIA2*, nous avons entrepris de compléter de façon pollen-spécifique cette lignée par la méthode dite de floral dip. La séquence de l'ADNc du gène At3g48820, nommé U19220, a d'abord été introduite dans un plasmide, par la méthode de clonage USER, sous le contrôle du promoteur PPE50 pollen-spécifique. Ce plasmide a été amplifié par introduction dans des bactéries compétentes DH5 α puis dans *Agrobacterium tumefaciens*. Des plantes *qrt1xsia2-2+/-* ont été transformées par la méthode de floral dip, et les graines de la 2^{ème} génération ont été semées sur milieu sélectif afin de conserver les graines possédant le plasmide. Avant que les plantes atteignent le stade floral, une PCR contrôle est réalisée afin de vérifier le profil génétique, c'est-à-dire, que la plante est bien *qrt1xsia2-2+/-* et qu'elle contient la construction PPE50::U19220 (**Fig. 34**). Le taux de germination du pollen issu de ces plantes complémentées a ensuite été comparé à celui des plantes *qrt1xsia2-2+/-* (**Tab. 3**).

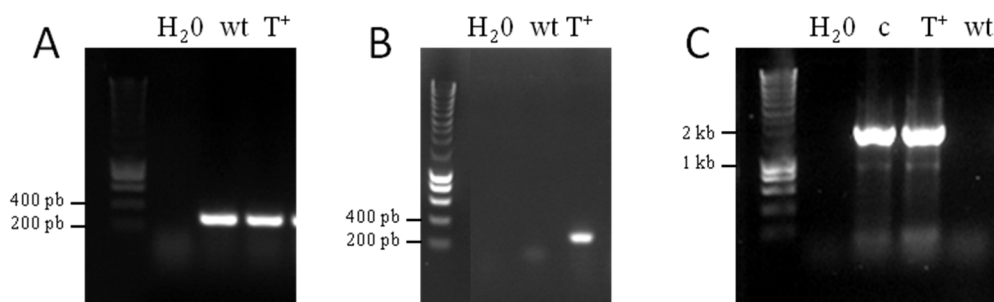


Figure 34 : Sélection des mutants *qrtxsia2-2+/-* complémentés avec la construction PPE50::U19220. Migration du produit PCR amplifié avec : A. le couple d'amorces sens et antisens *sia2-2* (taille attendue : 300 pb). B. l'amorce sens *sia2-2* et l'amorce de l'ADN-T LB2 (taille attendue : 250 pb). C. l'amorce sens PPE50 et l'amorce antisens pBI101.3 (taille attendue : 1824 bp). wt : ADN génomique extrait d'*Arabidopsis* sauvage ; c : ADN contrôle du plasmide utilisé pour la transformation d'agrobactéries ; T+ : ADN génomique extrait d'une plante *qrtxsia2-2+/-* transformée par floral dip.

Tableau 3 : Analyse de l'efficacité de la complémentation sur le taux de germination du pollen. Le pollen des plantes *qrt1xsia2-2+/-* complémentées ou non a été cultivé en milieu liquide pendant 6 h. Nombre de tétrades analysées ^a: 794; ^b: 575.

Génotype	% de tubes polliniques développés par tétrades				
	0	1	2	3	4
<i>qrt1xsia2-2+/-</i> ^a	50.0	30.5	14.8	4	0.8
PPE50:: <i>U19220</i> <i>qrt1xsia2-2+/-</i> ^b	40.7	31.8	20.4	6.7	0.4

Article 2. Imagerie du rhamnogalacturonane de type II par « click chemistry »

Dumont M, Lehner A, Vauzeilles B, Malassis J, Marchant A, Smyth K, Linciau B, Baron A, Mas Pons J, Anderson CT, Mollet JC, Lerouge P. Plant cell wall imaging by metabolic click-mediated labelling of rhamnogalacturonan II using azido 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid analogue.

Article en cours de rédaction pour soumission à *Plant Journal - Technical Advances*

La « click chemistry » n'a eu de cesse de se développer depuis son apparition au début du XXI^{ème} siècle. Dépassant le domaine de la chimie, les biologistes ont vu dans cette technique de nombreuses applications, que ce soit dans le domaine de la santé ou bien dans la recherche fondamentale afin de permettre l'imagerie de nombreuses molécules. Dans l'optique de développer un outil permettant de visualiser aisément et de manière spécifique le RG-II, nous sommes tournés vers la « click chemistry » en utilisant le 8-azido 8-deoxy Kdo (Kdo-N₃), un analogue du Kdo connu pour n'être retrouvé que dans le RG-II chez les plantes et déjà utilisé pour le marquage métabolique chez les bactéries à Gram négatif (Dumont *et al.*, 2012).

L'article suivant expose la caractérisation de cette méthode sur des plantules d'*Arabidopsis*, basée sur les travaux d'Anderson *et al.* (2012), avec notamment des expériences de contrôle qui nous ont permis de s'assurer que le Kdo-N₃ est incorporé spécifiquement dans la paroi *via* le métabolisme du Kdo. Ainsi, lorsque l'étape d'incorporation du Kdo-N₃ est réalisée en compétition avec son analogue naturel ou bien en présence des précurseurs métaboliques de ce dernier, tels que le D-Ara, le marquage est fortement réduit.

La dynamique du RG-II a pu être évaluée par une approche de « pulse chase ». Après une période d'incubation en présence de Kdo-N₃, les plantules sont transférées sur un milieu dépourvu du monosaccharide modifié pendant des temps croissants, avant de réaliser la réaction de click avec le fluorochrome adapté, en présence de cuivre. Après 22 h, nous observons une dilution du signal au niveau de la paroi des cellules de la zone d'élongation puisque ces cellules ont synthétisé de nouveaux composés pariétaux pendant l'incubation dans le milieu dépourvu de Kdo-N₃. Ainsi, seule la paroi apico-basale est encore fortement marquée, puisque celle-ci n'a que très peu évolué pendant la période de « chase ». La dynamique observée avec le Kdo-N₃ est similaire à celle observée par Anderson *et al.* (2012) avec le Fuc-AI, marqueur des

pectines. Les cellules situées dans la zone de différenciation n'ont pas révélé de dilution de signal après la période de 22 h de « sevrage » du Kdo-N₃, ce qui reflète une rigidité de la paroi dans ces cellules, qui ne subissent plus d'expansion cellulaire.

Nous avons voulu montrer que cette technique ne se limite pas seulement à l'étude de la paroi des racines d'*Arabidopsis*. Les cellules de tabac BY-2, qui constituent également un modèle très utilisé pour l'étude de la dynamique de la paroi cellulaire, peuvent incorporer l'analogue du Kdo dans leur paroi. Ainsi, nous espérons pouvoir continuer d'explorer la dynamique du RG-II avec ce modèle et cette fois-ci, *in vivo*, en utilisant les sondes cyclo-octynes qui ne requièrent pas l'utilisation du cuivre pour catalyser la réaction.

Plant cell wall imaging by metabolic click-mediated labelling of rhamnogalacturonan II using azido 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid analogue.

Marie Dumont¹, Arnaud Lehner¹, Boris Vauzeilles^{2,3}, Julien Malassis⁴, Alan Marchant⁵, Kevin Smyth⁵, Bruno Linclau⁵, Aurélie Baron², Jordi Mas Pons², Charles T. Anderson⁶, Jean-Claude Mollet¹ and Patrice Lerouge¹

¹Laboratoire Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale (Glyco-MEV), EA 4358, IRIB, VASI, Normandie Université 76821 Mont-Saint-Aignan, France.

² Institut de chimie moléculaire et des matériaux d'Orsay (ICMMO) UMR CNRS 8182, Université de Paris Sud 91405 Orsay, and Institut de chimie des substances naturelles (ICSN) UPR CNRS 2301, 91198 Gif-sur-Yvette, France.

³ Click4Tag, Zone Luminy Biotech, Case 922, 163 avenue de Luminy, 13009 Marseille, France.

⁴ Chemistry department, University of Southampton, Southampton SO50 7PS, UK

⁵ Centre for Biological Sciences, University of Southampton, Highfield Campus, Southampton, SO171BJ. UK

⁶ Department of Biology and Center for Lignocellulose Structure and Formation, The Pennsylvania State University, University Park, Pennsylvania, USA.

Running title : Rhamnogalacturonan-II imaging using click chemistry

Key words: Rhamnogalacturonan-II, click chemistry, Kdo-N₃, cell wall, *Arabidopsis*, BY-2 cells.

Abstract

In plants, 3-deoxy-D-*manno*-oct-2-ulosonic acid (Kdo) is a monosaccharide that is only found in the cell wall pectic rhamnogalacturonan-II (RG-II). Incubation of 4-day-old *Arabidopsis* light-grown seedlings or tobacco BY-2 cells with 8-azido 8-deoxy Kdo (Kdo-N₃) and then coupling to an alkyne-containing fluorescent probe resulted in the specific *in muro* labelling of RG-II through a copper-catalyzed azide–alkyne cycloaddition. CMP-Kdo synthetase inhibition and competition assays with Kdo and D-Ara, a precursor of Kdo, but not L-Ara demonstrated that incorporation of Kdo-N₃ occurs in RG-II through the endogenous biosynthetic machinery of the cell. Finally, by incubating the plants with Kdo-N₃ and an alkynated derivative of L-fucose, a co-localized fluorescence was observed in the cell wall of the root elongation cells. Moreover, pulse-chase experiments demonstrated that metabolic click-mediated labelling with Kdo-N₃ provides an efficient method to study the dynamics of RG-II in the cell walls of plants.

Introduction

Expression of target proteins fused to green fluorescent protein tags is routinely performed in cell biology for studying protein localisation in living cells. However, this efficient strategy cannot be extended to glycans and lipids. The use of bio-orthogonal chemical reporters offers an alternative for *in vivo* labelling of biomolecules without the requirement of genetic manipulations. In this method, a chemical motif is incorporated into the target biomolecule using the endogenous biosynthetic machinery of the cell. This chemical reporter is then covalently coupled in a highly selective and efficient reaction at room temperature with an exogenously delivered probe. The copper-catalyzed azide–alkyne cycloaddition, a type of so-called “click” chemistry, is the most widely used click-mediated labelling method in biology (Rostovtsev *et al.*, 2002; Tornøe *et al.*, 2002). The azide chemical reporter is usually selected for the incorporation step into biomolecules because of its small size, metabolic stability and the lack of reactivity with naturally occurring biological functions. Labelling is then performed

by copper-catalyzed linkage to reporter molecules carrying terminal alkynes as substrates. Among biology research topics, the study of cell-surface glycans largely benefited from the emergence of “click” chemistry in cell biology. This was performed in vertebrates and bacteria by metabolic glycan labelling of cells using a modified monosaccharide that contains a bio-orthogonal chemical reporter. Chemical ligation to a fluorescent probe then enabled the visualization of glycoconjugates that accumulate at the cell surface (Chang *et al.*, 2009; Dehnert *et al.*, 2011; Dumont *et al.*, 2012; Mas Pons *et al.*, 2014).

Although “click” chemistry has been widely used in animal and bacterial biology, this approach has received limited attention in plant biology to date. Click chemistry was recently used to label cells undergoing DNA synthesis while following a Golgi protein marker fused to a fluorescent protein (Bourge *et al.*, 2015). To date, only a few studies have reported plant cell wall imaging using a click chemistry approach. Several studies have recently reported on the imaging of plant cell wall lignification using different azido- and alkynyl-tagged monolignols (Tobimatsu *et al.*, 2014; Bukowski *et al.*, 2014; Pandey *et al.*, 2015). In addition, an alkyne derivative of L-fucose (Fuc-Al) has been used for cell wall labelling in *Arabidopsis* (Anderson *et al.*, 2012). In this study, the authors demonstrated that seedlings fed with peracetylated alkyne derivative of L-fucose, incorporated this L-Fuc analogue in their cell wall pectic polysaccharides. Chemical ligation to a fluorescent azide-containing probe enabled the labelling of primary cell walls of *Arabidopsis* seedling roots. This fucose-alkyne-based labelling strategy was also used to investigate the secretion of the pectic polymer rhamnogalacturonan-I in mutants lacking the kinesin FRAGILE FIBER 1 (FRA1) that exhibited defects in the secretion of cell wall polysaccharides (Zhu *et al.*, 2015). Pectins are

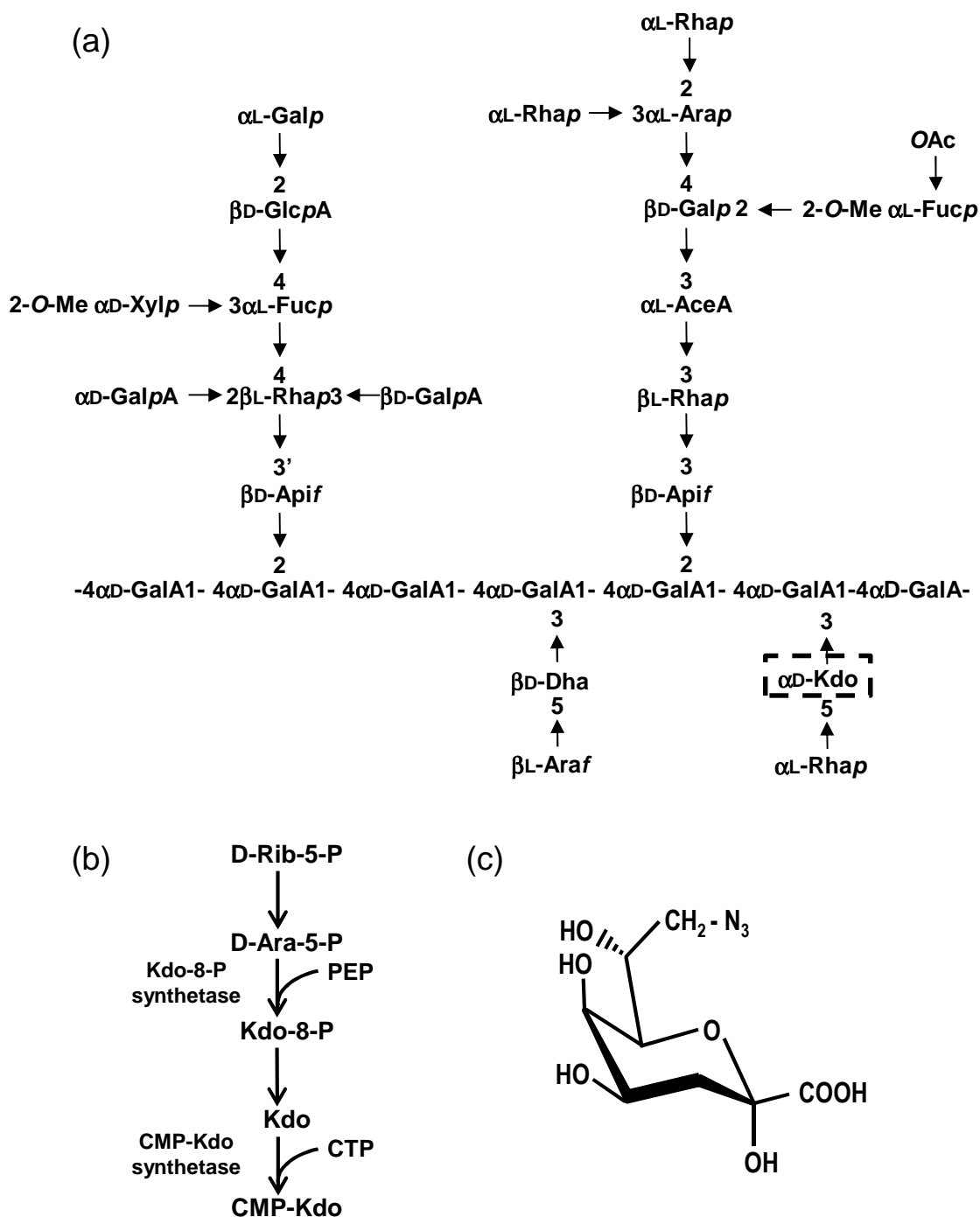


Figure 1

(a) Structure of rhamnagalacturonan II (RG-II) with the location of Kdo indicated in a dashed box.

(b) Biosynthetic pathway of CMP-Kdo.

(c) Structure of the 8-azido 8-deoxy Kdo (Kdo-N₃).

composed of α -1,4-linked homogalacturonan (HG) and of rhamnogalacturonan I (RG-I) which consists of arabinan and galactan chains linked to a $[\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GalpA-(1}\rightarrow]$ repeating disaccharide backbone. A third pectic molecule, rhamnogalacturonan II (RG-II) represents only about 2-4% of the primary cell wall in plants (O'Neill *et al.*, 2004; Bar-Peled *et al.*, 2012). RG-II is composed of a HG backbone that is substituted with four oligosaccharide side chains (Fig. 1a) (O'Neill *et al.*, 2004). At least 12 different glycosyl residues are present in RG-II, including several rare sugars such as aceric acid, apiose, 3-deoxy-D-lyxo-hept-2-ulosonic acid and 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid (Kdo) (O'Neill *et al.*, 2004). Despite its complex structure, RG-II is evolutionarily conserved in the plant kingdom and is present in the primary cell wall of all higher plants, predominantly in the form of a dimer that is cross-linked by a borate di-ester bond between two apiosyl residues (O'Neill *et al.*, 1996; Kobayashi *et al.*, 1996). Boron or RG-II biosynthesis deficiencies result in altered plant growth and changes in the cell wall architecture. This demonstrates the primordial function of boron-mediated RG-II cross-linking to generate a covalently cross-linked pectic network that is required for plant growth (Fleischer *et al.*, 1998; Fleischer *et al.*, 1999; O'Neill *et al.*, 2001; Voxeur *et al.*, 2011; Dumont *et al.*, 2014). Nevertheless, the precise function of RG-II remains unclear to date. Moreover, despite its crucial importance in primary cell wall synthesis and elongation, little is known about its biosynthesis and *in planta* localisation and turnover. Carbohydrate-binding proteins, such as lectins and antibodies, have been demonstrated to be highly valuable tools for the investigation of the complexity and diversity of RG-I, HG and hemicelluloses at the cell and tissue levels (Lee *et al.*, 2011). With the exception of rabbit polyclonal and Fab antibodies reported by Match *et al.* (1998) and Williams *et al.* (1996), most of the efforts to obtain specific antibodies against RG-II for immunocytochemistry studies have been unsuccessful. As a consequence, tools for studying RG-II distribution and dynamics within the plant cell are lacking.

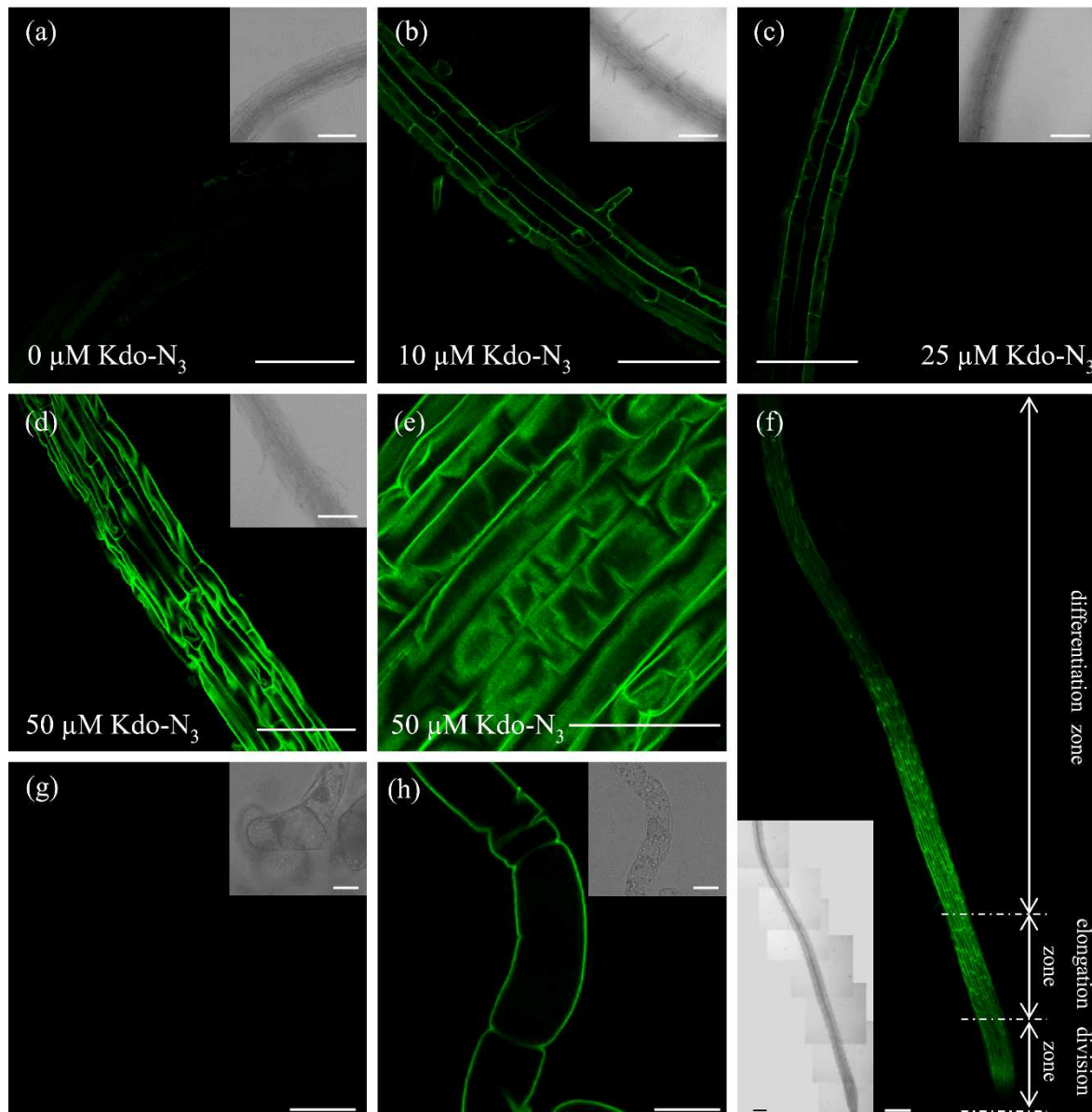


Figure 2: Confocal microscope images of roots of four-day-old light-grown *Arabidopsis thaliana* seedlings and BY-2 tobacco cells.

(a) to (e) Seedlings were incubated for 16 h in MS containing from 0 to 50 μM Kdo- N_3 and treated with Alexa Fluor[®] 488 alkyne in copper-catalyzed conditions. Scale bars 100 μm .

(f) Overall view of a Kdo- N_3 -labelled root. Scale bar 100 μm .

(g) and (h) Three-day-old tobacco BY-2 cells were incubated in liquid MS medium containing 0 μM (g) or 100 μM Kdo- N_3 (h) for 16 h and then labelled with 0.1 μM Alexa 488-alkyne for 1 h in copper-catalyzed conditions. Scale bars 20 μm .

Inserts correspond to the transmitted light images.

As mentioned above, Kdo is one of the constitutive monosaccharides of RG-II. This 3-deoxy acidic sugar is also present in the inner core of the lipopolysaccharide (LPS) of Gram-negative bacteria. As in bacteria, this sugar is synthesised in the cytosol by the isomerisation of D-ribulose-5-P (D-Rib-5-P) into D-arabinose-5-P (D-Ara-5-P), followed by its coupling to phosphoenol pyruvate (PEP) to yield Kdo-8-phosphate (Kdo-8-P) (Matsuura *et al.*, 2003; Delmas *et al.*, 2008) (Fig. 1b). After dephosphorylation of Kdo-8-P and coupling to CMP by a CMP-Kdo synthetase (Royo *et al.*, 2000), the activated CMP-Kdo sugar nucleotide is transported into the Golgi apparatus and transferred to the RG-II backbone, probably by sialyl-like transferases (Deng *et al.*, 2010, Dumont *et al.*, 2014). 8-azido 8-deoxy Kdo (Kdo-N₃, Fig. 1c) was recently used to detect living bacteria through the labelling of LPS (Dumont *et al.*, 2012). This study demonstrated that Kdo-N₃ was efficiently incorporated into the bacterial glycosylation machinery. Moreover, modification of the C8-position of Kdo with an azido group prevents reverse metabolism by Kdo-8-P phosphatase and dissemination of the azido bio-orthogonal chemical reporter into other cell metabolites, which might result in a loss of labelling specificity.

In this article, we report the metabolic labelling of plant cell walls using Kdo-N₃ (Fig. 1c). We show that 4-day-old light-grown *Arabidopsis thaliana* seedlings and tobacco BY-2 cells are able to metabolically integrate into their pectic cell walls the azido Kdo analogue that can then be efficiently coupled to an alkyne-containing fluorescent probe *via* a copper-catalyzed azide–alkyne cycloaddition.

Results

Metabolic click-mediated labelling of plant tissues was investigated with the 8-azido Kdo analogue because this monosaccharide is specific for RG-II and the Kdo C-8 hydroxy group is

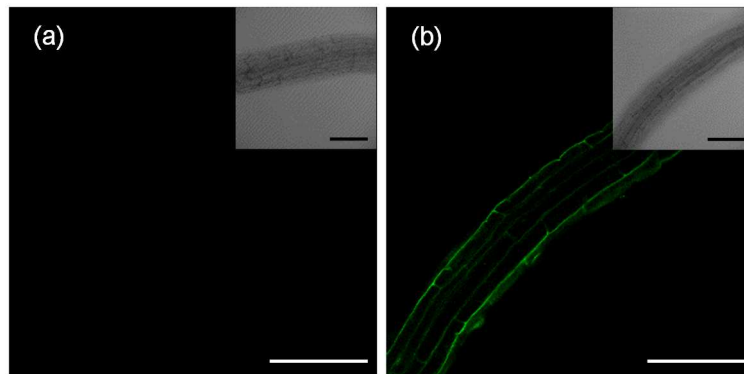


Figure 3 : Control experiments for Kdo-N₃ incorporation.

Chemical fixation of seedlings using 4% paraformaldehyde before (a) or after (b) Kdo-N₃ incorporation, and labelled. Seedlings viability is required for Kdo-N₃ incorporation but not for the click chemistry reaction. Inserts correspond to the transmitted light images. Scale bars 100 µm.

not involved in the linkage to the rhamnose residue in the RG-II Kdo-containing side-chain (Fig. 1a). Four-day-old light-grown *Arabidopsis thaliana* seedlings were incubated for 16 h in liquid Murashige and Skoog (MS) medium containing from 2.5 to 50 μM Kdo- N_3 . Seedlings were then transferred for 1 h to a solution of Alexa Fluor[®] 488-alkyne, a membrane-impermeable probe, in copper-catalyzing conditions before observation of fluorescence in cell walls by confocal microscopy. As shown in Fig. 2a-f, Kdo- N_3 treated seedlings exhibited a strong labelling of their root cell walls. The highest labelling intensity was obtained with 50 μM Kdo- N_3 . (Fig. 2d-e). The labelling occurs throughout all the primary epidermal cell walls in the division and elongation zones of seedling roots (Fig. 2f). The same experiment was carried out on suspension cultured tobacco Bright Yellow-2 (BY-2) cells. As illustrated in Fig. 2g-h, a strong labelling of the cell wall of tobacco cells was observed. No labelling of cell walls was observed in seedlings treated with Kdo- N_3 or the fluorescent probe alone (Fig S1). To investigate whether cell viability is required for Kdo- N_3 incorporation, seedlings were treated with the Kdo analogue before or after fixation with 4% paraformaldehyde and then labelled with Alexa Fluor[®] 488-alkyne. Seedlings treated with Kdo- N_3 , then fixed before coupling to the fluorophore tag exhibited strong cell wall labelling. In contrast, no fluorescence of the root tissues was observed in seedlings previously fixed. This demonstrated that the incorporation of Kdo- N_3 occurred in living tissues only (Fig. 3a-b).

Click-mediated labelling of *Arabidopsis thaliana* seedlings was then performed in the presence of 2 β -deoxy Kdo, an inhibitor of cytosolic CMP-Kdo synthetase that converts free Kdo to its activated nucleotide-sugar CMP-Kdo (Fig. 1b) (Smyth *et al.*, 2013). In these conditions, a strong decrease of the cell wall labelling was observed compared to the control (Fig. 4a). This observation supports the hypothesis that incorporation of Kdo- N_3 in the cell wall occurs through the endogenous Kdo biosynthetic machinery. Altogether, these data

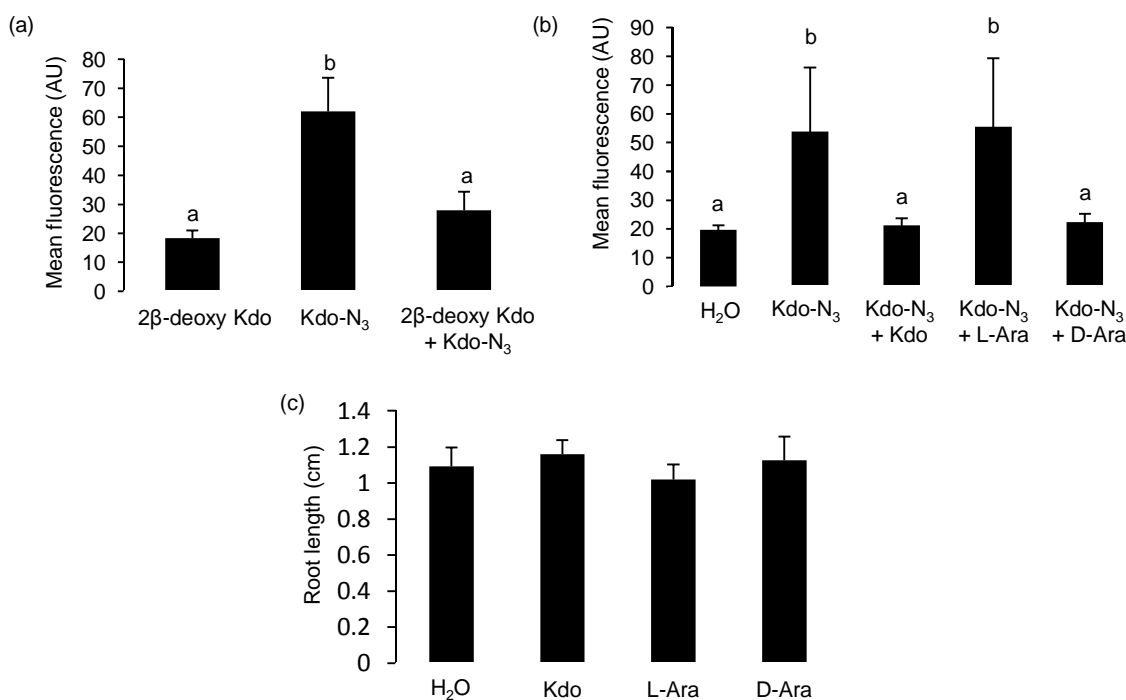


Figure 4 : Inhibition of Kdo-N₃ incorporation.

(a) Quantification of the root-tip fluorescence in 4-day-old seedlings grown on MS medium supplemented with or without 150 μM 2β-deoxy-Kdo. Seedlings were then transferred in liquid MS medium containing 50 μM Kdo-N₃ with or without 150 μM 2β-deoxy-Kdo. Data are expressed +/- SEM (n>5 seedlings from two experiments). Similar letter indicates that no significant difference were observed whereas different letters indicates a highly significant difference between the conditions (Mann-Whitney test, p<0.01).

(b) Quantification of the root-tip fluorescence in seedlings treated for 16 h with 50 μM Kdo-N₃ +/- 25 mM Kdo, L-Ara or D-Ara. Error bars represent SEM (n = 10-12 seedlings for each experiment). Data are the mean of at least two experiments. Similar letter indicates that no significant difference were observed whereas different letters indicates a highly significant difference between the conditions (One way ANOVA test, p<0.05).

(c) Root length of 4-day-old seedlings grown in liquid MS alone or with 25 mM Kdo, D-Ara or L-Ara for 16 h. Error bars represent SEM (n = 12 seedlings). No significant difference was observed for the root elongation (Mann-Whitney test, p>0.05).

indicate that the fluorescence of click-labelled cell walls in *Arabidopsis* root seedlings results from the incorporation of Kdo-N₃ into RG-II, the sole Kdo-containing cell wall polysaccharide. This likely occurs through the endogenous metabolism of living plant cells and not from non-specific absorption of Kdo-N₃ to the cell wall.

D-arabinose-5-phosphate (D-Ara-5-P) is the metabolic precursor of Kdo in plants (Fig. 1b). In the presence of D-Ara, metabolic click-labelling of *Arabidopsis* cell walls using Kdo-N₃ was strongly inhibited whereas no inhibition was observed with L-Ara, the isomer found in several cell wall polysaccharides (Fig. 4b). The inhibition of labelling was also observed in seedlings fed with Kdo (Fig. 4b). This competitive inhibition observed with D-Ara and Kdo further confirmed that the incorporation of Kdo-N₃ occurred through the Kdo biosynthesis pathway. Root elongation was not affected in these experiments (Fig. 4c) indicating that inhibition of Kdo-N₃ incorporation was not due to the toxicity of D-Ara or Kdo.

Double labelling was tested using alkyne derivative of L-fucose (Fuc-Al) and Kdo-N₃ to take advantage of the fact that these two sugar analogues carry different bio-orthogonal chemical reporters. Four-day-old light-grown *Arabidopsis thaliana* seedlings were incubated for 16 h in MS medium containing 50 µM Kdo-N₃ and 50 µM of peracetylated Fuc-Al. Coupling to Alexa Fluor[®] 488-alkyne (Fig. 5a) and Alexa Fluor[®] 594-azide (Fig. 5b) fluorescent probes enabled the double labelling of cell walls (Fig. 5c). Co-localization of the labelling using the two monosaccharide analogues suggests that incorporation of Kdo and Fuc analogues occurred in pectic cell wall polysaccharides.

Pulse-chase experiments (Fig. 6) were performed by incubating *Arabidopsis* seedlings with Kdo-N₃ and then chasing for 22 h to investigate the *in muro* cell wall RG-II dynamics. After 4 h of incubation with Kdo-N₃, incorporation pattern was homogeneously distributed in the cell wall in the elongation zone (Fig. 6a). After chasing for 22 h, only the shootward and rootward borders (Baskin *et al.*, 2010) of the elongated cells showed a strong labelling in the

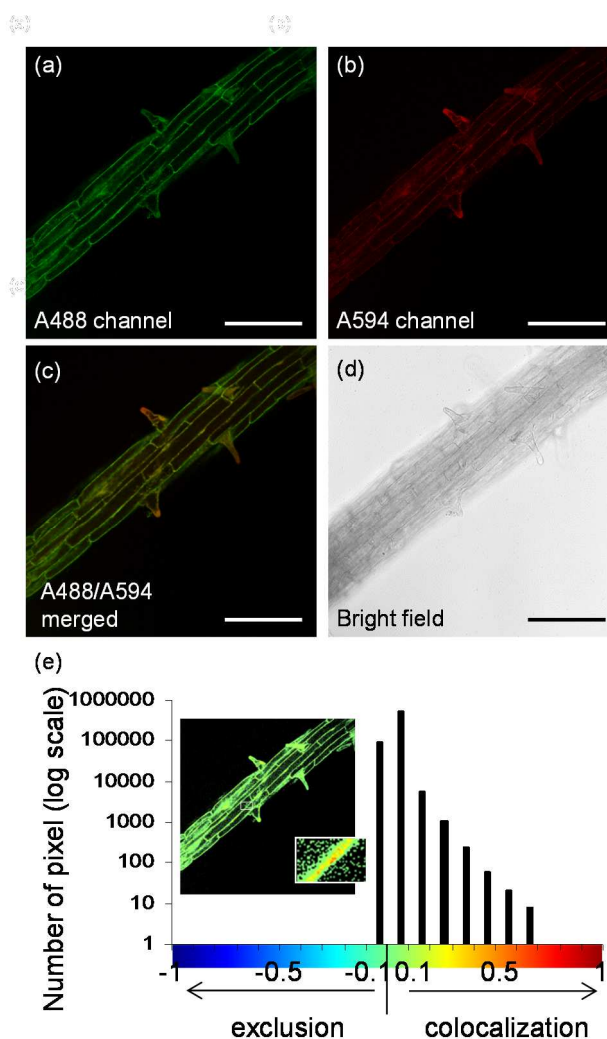


Figure 5 : Kdo-N₃ and Fuc-A1 are co-localised in cell walls.

Four-day-old *Arabidopsis* seedlings were incubated in liquid MS medium supplemented with 50 μ M Fuc-A1 and 50 μ M Kdo-N₃ for 16 h and then successively labelled 1 h with Alexa Fluor[®] 594-N₃ (A594) and then with Alexa Fluor[®] 488-alkyne (A488) in copper-catalyzed conditions.

(a) Elongation zone observed with the A488 channel.

(b) Same elongation zone than in (a) observed with the A594 channel.

(c) Elongation zone observed with merged A488 and A594 channels.

(d) Bright-field image of the elongation zone. Scale bars 100 μ m.

(e) Number of co-localized pixels between A488 channel (a) and A594 channel (b) and color map representation of the intensity of colocalization between A488 channel and A594 channel. In this color map, the -1 to +1 heat map depicts the measured I_{corr} values regarding the color bar where negatively correlated relationships (values between -1 and -0.1) are shown in *dark blue- light blue* colors, and positive correlations (values between 0.1 and 1) are represented by warmer *green-red* colors.

elongation zone (Fig. 6c). In contrast, the labelling of the cell walls parallel to the elongation of the cells was weak and diffuse, revealing a dilution of the signal due to newly deposited cell wall material during the elongation of the cells. Cells in the differentiation zone are not expected to greatly expand or add large amounts of new material to their walls. This is reflected by a lack of labelling in the differentiation zone after the 4 h incorporation (Fig. 6b). In contrast, the cells in the differentiation zone after 22 h of chase, which had been in the elongation zone during the pulse of Kdo-N₃ incubation, displayed homogenous labelling (Fig. 6d). These results suggest that when the root cells are differentiated, primary cell wall deposition is reduced.

Discussion

Several lines of evidence demonstrate that incubation of *Arabidopsis* seedlings or tobacco BY-2 cells with Kdo-N₃ and then coupling to an alkyne-containing fluorescent probe in the presence of Cu(I) results in the specific *in muro* labelling of RG-II. First, Kdo is only found in RG-II. Second, click-mediated labelling of cell walls is abolished in presence of 2β-deoxy Kdo, an inhibitor of the cytosolic CMP-Kdo synthetase that is able to activate free Kdo into its nucleotide sugar in the cytosol (Misaki *et al.*, 2009; Smyth *et al.*, 2013). Third, Kdo-N₃ incorporation only occurs in living tissues and can be inhibited by addition of Kdo and D-Ara. D-Ara is only involved in plant cell wall metabolism as a precursor of Kdo in the RG-II biosynthetic pathway (Fig. 1b). In contrast, its L-isomer is widely distributed in arabinan, arabinoxylan and proteoglycan cell wall polymers (Carpita and Gibeaut, 1993). The inhibition of labelling with Kdo-N₃ upon feeding seedlings with D-Ara suggests that D-Ara likely reaches cellular metabolism *via* the salvage pathway where it can compete with D-Ara-5-P for cytosolic Kdo synthesis (Fig. 1b). Plant Kdo-8-P synthetases have been reported to be specific

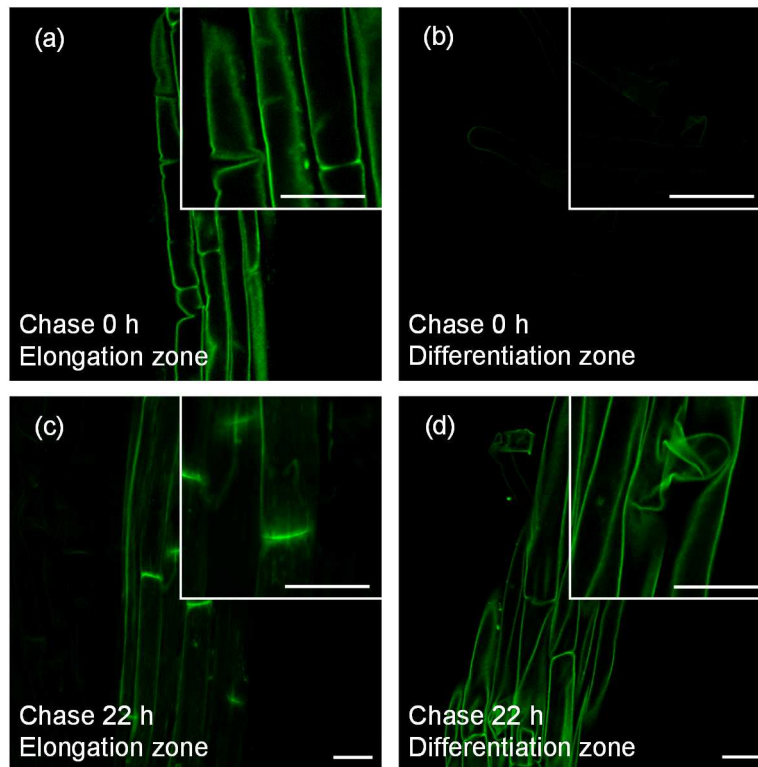


Figure 6 : Pulse-chase analysis of Kdo-N₃ incorporation.

Four-day-old Col-0 seedlings were treated with a 4 h pulse of 200 μ M Kdo-N₃, washed, plated on MS plates without Kdo-N₃ for 0 h (a)-(b) and 22 h (c)-(d), and labelled with Alexa Fluor[®] 488-alkyne. (a) and (c) correspond to the elongation zone, (b) and (d) correspond to the differentiation zone of rhizodermal cells. Inserts correspond to close-up views. Scale bars: 25 μ m.

for D-Ara-5-P, which arises from the cytosolic isomerisation of D-ribulose-5-P (Fig. 1b). However, the activity of these synthetases was studied by complementation assays of bacterial strains impaired in endogenous Kdo-8-P synthetase activity (Brabetz *et al.*, 2000; Matsuura *et al.*, 2003; Delmas *et al.*, 2003) or using D-Ara-5-P as substrate in enzyme bioassays (Delmas *et al.*, 2003). Inhibition of Kdo-N₃ incorporation with D-Ara suggests that phosphorylation of D-Ara is not required for its coupling to PEP by cytosolic Kdo-8-P synthetases (Fig. 1b).

Click-mediated metabolic labelling using Kdo-N₃ resulted in efficient imaging of RG-II in the primary cell walls. This labelling strategy appears as an alternative to the use of antibodies for studying RG-II distribution and dynamics. In agreement with immunocytochemistry studies (Matoh *et al.*, 1998; Williams *et al.*, 1996), the labelling of plant seedlings with Kdo-N₃ reported in this study confirms that RG-II exists throughout primary cell walls. This labelling is observed in cells located in the division and the elongation zones where pectin synthesis occurs. Pulse-chase experiments were used to track RG-II in the cell wall during elongation. After 22 h of chase, only the shootward and rootward borders of elongation zone cells were still brightly fluorescent. A similar observation was made by Anderson *et al.* (2012) using a 6-alkyne L-fucose analogue; our results indicate that expansion of lateral cell walls during elongation led to the dilution of RG-II signal due to wall expansion and the delivery of newly synthesized, unlabelled cell wall polymers.

Although metabolic click-mediated labelling is efficient for cell surface labelling, the high cytotoxicity of copper ions required for the azide–alkyne cycloaddition limits its use in living cells. As a consequence, copper free click reactions have been recently developed using ring-strained cyclooctyne moiety. This allows labelling to be performed in living organisms with minimal physiological perturbations (Chang *et al.*, 2009; Laughlin and Bertozzi, 2009; Dehnert *et al.*, 2011; Boyce and Bertozzi, 2011). However, considering the large size of

cyclooctyne motifs, this biocompatible “click” chemistry strategy requires the metabolic incorporation of azido sugars. In contrast to 6-alkyne L-fucose used for plant cell wall labelling, it was reported that plant cells were unable to incorporate a 6-azido fucose analogue (Anderson *et al.*, 2012). In this respect, Kdo analogue appears as appropriate probes for metabolic click-mediated labelling of the cell wall in living plant cells using cyclooctyne-containing fluorescent probes.

Experimental protocols

Sugar analogues

8-azido-3,8-dideoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid (Kdo-N₃) was synthesized according to Dumont *et al.*, (2012). 2β-deoxy Kdo was synthesised according to a literature procedure (Claesson, 1987; López-Herrera and Sarabia-Garcia, 1997) that was slightly modified (see Methods S1).

Plant culture and growth conditions.

Arabidopsis thaliana Col-0 seeds were surface sterilized in 50% (v/v) ethanol for 5 min, in 30% (v/v) sodium hypochlorite for 2 min, washed 5 times in sterile water and incubated at 4°C for at least 48 h. Sterilized seeds were deposited on Murashige and Skoog (MS 2.2 g/L) mineral medium containing 1% sucrose and 0.8% plant agar. The plates were placed vertically in a growth chamber for 4 d at 22°C under a 16 h light / 8 h dark cycle. Suspension cells of *Nicotiana tabacum* L. cv Bright Yellow 2 (BY-2) were cultured in MS liquid medium (MS; 4.3 g/L, 30 g/L sucrose, 100 mg/L KH₂PO₄, 51 mg/L myo-inositol, 1 mg/L thiamine, 0,22 mg/L 2,4 dichlorophenoxyacetic acid, pH 5.6) in the dark at 22°C and 140 rpm. Cells were sub-cultured every week by transferring 10 mL of suspension cells in 150 mL of fresh medium.

Incorporation of Kdo-N₃ and fluorescent labelling

Four-day-old light-grown seedlings were transferred from MS medium plates to 1 mL of liquid MS containing from 2.5 to 50 μM Kdo- N_3 for 16 h at 22°C. Seedlings were then washed three times with liquid MS and then transferred in 1 mL of 0.1 μM Alexa Fluor® 488 alkyne (Life Technology) solution in liquid MS containing 1 mM CuSO_4 and 1 mM ascorbic acid. The solution was incubated for 1 h at room temperature in the dark. Seedlings were then washed once in liquid MS supplemented with 0.01% (v/v) Tween 20 for 5 min, three more times in liquid MS and finally with distilled water. Control experiments were carried out by omitting either the Kdo- N_3 or the fluorescent probe in the click labelling assays. Inhibition of the CMP-Kdo synthetase was carried out by adding 150 μM 2 β -deoxy Kdo to the MS medium and then, by complementing the liquid MS with the same concentration of inhibitor during the Kdo- N_3 incorporation step (Smyth *et al.*, 2013). Inhibition assays were carried out by adding 25 mM D-Ara, L-Ara or Kdo to the growth medium. Root lengths of 4-d-old seedlings were measured using ImageJ software (Abramoff *et al.*, 2004).

For labelling of tobacco BY-2 cells, Kdo- N_3 was diluted to 200 μM in 0.5 mL liquid MS medium. 0.5 mL of 3-day-old suspension BY-2 cells in logarithmic growth was added. Cells were then incubated for 16 h. Cells were rinsed three times with liquid MS medium by centrifugation (2 min, 700 g). Click reactions were performed by incubating BY-2 cells in 500 μL of labelling solution containing 0.1 μM Alexa Fluor® 488-alkyne, 1 mM CuSO_4 and 1 mM ascorbic acid in liquid MS for 1 h, in the dark with gentle shaking. Cells were then rinsed once with 500 μL liquid MS, then incubated for 5 min in liquid MS supplemented with Tween 20 (0.01%, v/v), rinsed three more times with liquid MS for 5 min each and finally with water.

Pulse chase

For pulse chase experiments, 4-day-old *Arabidopsis* seedlings were incubated in 200 μM Kdo- N_3 in liquid MS for 4 h, washed three times with liquid MS and then transferred to solid MS. Seedlings were labelled as previously described after 0 h and 22 h chase, washed and imaged.

Double staining using Fucose-alkyne and Kdo- N_3

A 1 mM solution of peracetylated 6-alkyne L-fucose (Fuc-Al, Life Technologies) was prepared by dissolving in DMSO and then diluted to the desired concentration in MS medium. Four-day-old light-grown seedlings were transferred from MS medium plates to 1 mL of liquid MS containing 50 μM of Fuc-Al and 50 μM Kdo- N_3 for 16 h at 22°C. Seedlings were washed and then incubated in 1 mL of labelling solution [liquid MS containing 0.1 μM Alexa Fluor[®] 594-azide (Life Technologies), 1 mM CuSO_4 , 1 mM ascorbic acid] for 1 h at room temperature. After one washing step with liquid MS, seedlings were then labelled with 1 mL of 0.1 μM Alexa Fluor[®] 488-alkyne. Seedlings were washed as described for single labelling and imaged.

Microscopy

The roots of labelled seedlings and the BY-2 cells were observed with the Leica TCS SP2 AOBS confocal microscope (488-nm excitation filter; 495-550 nm emission filter for Alexa 488 and 594-nm excitation filter; 610-670 nm emission filter for Alexa 594). For double staining experiment, images were acquired in the sequential scan mode. Images were acquired with identical exposure settings. The fluorescence intensity of the root was calculated with ImageJ by thresholding (pixel intensity >16) to select the root boundary and measuring the mean of pixel intensity inside the area defined by the threshold. The ImageJ colocalization Colormap plugin was used to determine the correlation index (I_{corr}), which is the fraction of positively correlated pixels between two fluorescent populations. The plugin is based on the method originally described by Jaskolski *et al.*, (2005).

Statistical analysis

The data were analysed statistically by GraphPad Software (La Jolla, CA, USA; www.graphpad.com). Differences were considered statistically significant when $p \leq 0.05$.

Acknowledgements:

This work was supported by the University of Rouen and the “Trans Channel Wallnet” project that has been selected in the context of the INTERREG IVA France (Channel) – England European cross-border cooperation programme, which is co-financed by the ERDF.

Images were obtained on PRIMACEN (<http://www.primacen.fr>), the Cell Imaging Platform of Normandy, IRIB, Faculty of Sciences, University of Rouen, 76821 Mont-Saint-Aignan, France.

The authors are also thankful to the Grand Réseau de Recherche VASI de Haute Normandie for the use of equipments and to Grégory Mouille for technical advice.

References

- Abramoff, M.D., Magalhães, P.J. and Ram, S.J.** (2004) Image processing with ImageJ. *Biophotonics Int.*, 11, 36–42. **Anderson, C., Wallace, I.S. and Somerville, C.R.** (2012) Metabolic click-labelling with a fucose analog reveals pectin delivery, architecture, and dynamics in Arabidopsis cell walls. *PNAS* 109, 1329-1334.
- Anderson, C.T., Wallace, I.S. and Somerville, C.R.** (2012) Metabolic click-labeling with a fucose analog reveals pectin delivery, architecture, and dynamics in Arabidopsis cell walls. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **109**, 1329–1334.
- Bar-Peled, M., Urbanowicz, B.R. and O'Neill, M.** (2012) The synthesis and origin of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II - insights from nucleotide sugar formation and diversity. *Front Plant Sci.* 3, 92
- Baskin, T.I., Peret, B., Baluška, F., Benfey, P.N., Bennett, M., Forde, B.G., Gilroy, S., Helariutta, Y., Hepler, P.K., Leyser, O., Masson, P.H., Muday, G.K., Murphy, A.S., Poethig, S., Rahman, A., Roberts, K., Scheres, B., Sharp, R.E., Somerville, C.** (2010) Shootward and rootward: peak terminology for plant polarity. *Trends Plant Sci.* **15**, 593–594.
- Boons, G. J. P. H., van der Klein, P. A. M., van der Marel, G. A. and van Boom, J. H.** (1990) A practical route toward the preparation of 4,5:7,8-di-*O*-isopropylidene KDO ethyl ester. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, **109**, 273–276.

- Bourge, M., Fort, C., Soler, M.-N., Satiat-Jeunemaître, B. and Brown, S.C.** (2015) A pulse-chase strategy combining click-EdU and photoconvertible fluorescent reporter: tracking Golgi protein dynamics during the cell cycle. *New Phytol.*, **205**, 938–950.
- Boyce, M. and Bertozzi, C.R.** (2011) Bringing chemistry to life. *Nat. Met.* **8**, 638-642.
- Brabetz, W., Wolter, F.P. and Brade, H.** (2000) A cDNA encoding 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosate-8-phosphate synthetase of *Pisum sativum* L. (pea) functionally complements a kdsA mutant of the Gram-negative bacterium *Salmonella enterica*. *Planta* **212**, 136–143.
- Bukowski, N., Pandey, J.L., Doyle, L., Richard, T.L., Anderson, C.T. and Zhu, Y.** (2014) Development of a clickable designer monolignol for interrogation of lignification in plant cell walls. *Bioconj. Chem.* **25**, 2189-2196.
- Carpita, N.C. and Gibeaut, D.M.** (1993) Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.* **3**, 1-30.
- Chang, P. V., Chen, X., Smyrniotis, C., Xenakis, A., Hu, T., Bertozzi, C. R. and Wu, P.** (2009) Metabolic labeling of sialic acids in living animals with alkynyl sugars. *Angew. Chem.*, **48**, 4030-4033.
- Claesson, A.** (1987) New synthesis of a CMP-KDO synthetase inhibitor and of 2-deoxy-KDO derivatives used in the synthesis of such inhibitors. *J. Org. Chem.*, **52**, 4414-4416.
- Dehnert, K.W., Beahm, B.J., Huynh, T.T., Baskin, J.M., Laughlin, S.T., Wang, W., Wu, P., Amacher, S.L. and Bertozzi, C.R.** (2011) Metabolic labeling of fucosylated glycans in developing zebrafish. *ACS Chem. Biol.* **6**, 547-552.
- Delmas, F., Petit, J., Joubes, J., Séveno, M., Paccalet, T., Hernould, M., Lerouge, P., Mouras, M. and Chevalier, C.** (2003) The gene expression and enzyme activity of plant 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid-8-phosphate synthase are preferentially associated with cell division in a cell cycle-dependent manner. *Plant Physiol.* **133**, 348–360.
- Delmas, F., Séveno, M., Northey, J.G.B., Hernould, M., Lerouge, P., Mc Court, P. and Chevalier C.** (2008) The synthesis of the rhamnogalacturonan II component 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid (Kdo) is required for pollen tube growth and elongation. *J. Exp. Bot.* **59**, 2639-2647.
- Deng, Y., Wang, W., Li, W.-Q., Xia, C., Liao, H.-Z., Zhang, X.-Q. and Ye, D.** (2010) *MALE GAMETOPHYTE DEFECTIVE 2*, encoding a sialyltransferase-like protein, is required for normal pollen germination and pollen tube growth in Arabidopsis. *J. Integr. Plant Biol.*, **52**, 829–843.
- Dumont, A., Malleron, A., Awwad, M., Dukan, S. and Vauzeilles B.** (2012) Click-mediated labeling of bacterial membranes through metabolic modification of the lipopolysaccharide inner core. *Angew. Chem.* **51**, 3143-3146.

- Dumont, M., Lehner, A., Bouton, S., Kiefer-Meyer, M.C., Voxeur, A., Pelloux, J., Lerouge, P. and Mollet, J.C.** (2014) The cell wall pectic polymer rhamnogalacturonan-II is required for proper pollen tube elongation: implication of a putative sialyltransferase-like protein. *Ann. Bot.*, **114**, 1177-1188.
- Fleischer, A., Titel, C. and Ehwald, R.** (1998) The boron requirement and cell wall properties of growing and stationary suspension-cultured *Chenopodium album* L. cells. *Plant Physiol.*, **117**, 1401–1410.
- Fleischer, A., O'Neill, M.A. and Ehwald, R.** (1999) The pore size of non-graminaceous plant cell walls is rapidly decreased by borate ester cross-linking of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II. *Plant Physiol.*, **121**, 829–838.
- Jaskolski, F., Mülle, C. and Manzoni, O.J.** (2005) An automated method to quantify and visualize colocalized fluorescent signals. *J Neurosci Methods*. **146**, 42-9.
- Kobayashi, M., Matoh, H. and Azuma, J.** (1996) Two chains of rhamnogalacturonan II are cross-linked by borate-diol ester bonds in higher plant cell walls. *Plant Physiol.* **110**, 1017-1020.
- Laughlin, S.T. and Bertozzi, C.R.** (2009) *In vivo* Imaging of *Caenorhabditis elegans* glycans. *ACS Chem. Biol.* **4**, 1068-1072.
- Lee, K.J., Marcus, S.E. and Knox P.** (2011) Cell wall biology: perspective from cell wall imaging. *Mol Plant* **4**, 212-219.
- Lopez-Herrera, F. J.; Sarabia-Garcia, F.** (1997) Condensation of D-mannosaldehyde derivatives with ethyl diazoacetate. An easy and stereoselective chain elongation methodology for carbohydrates: Application to new syntheses for KDO and 2-deoxy-beta-KDO. *Tetrahedron* **53**, 3325-3346.
- Martinková, M., Pomikalová, K., Gonda, J. and Vilková, M.** (2013) A common approach to the total synthesis of L-arabino-, L-ribo-C₁₈-phytosphingosines, ent-2-epi-jaspine B and 3-epi-jaspine B from D-mannose. *Tetrahedron* **69**, 8228.
- Mas Pons, J., Dumont, A., Sautejeau, G., Fugier, E., Baron, A., Dukan, S. and Vauzeilles B.** (2014) Identification of living *Legionella pneumophila* using species-specific metabolic lipopolysaccharide labeling. *Angew. Chem.* **27**, 1275-1278.
- Matoh, T., Takasaki, M., Takabe, K. and Kobayashi, M.** (1998) Immunocytochemistry of rhamnogalactouronan II in cell walls of higher plants. *Plant Cell Physiol.* **39**, 483–491.
- Matsuura, K., Miyagawa, I., Kobayashi, M., Ohta, D. and Matoh, T.** (2003) *Arabidopsis* 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonate-8-phosphate synthase: cDNA cloning and expression analyses. *J. Exp. Bot.* **54**, 1785-1787.
- Misaki, R., Kajiura, H., Fujii, K., Fujiyama, K. and Seki, T.** (2009). Cloning and characterization of cytidine monophosphate-3-deoxy-D-manno-octulosonate synthetase from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biosci. Bioeng.* **108**,527-529.

- O'Neill, M.A., Warrenfeltz, D., Kates, K., Pellerin, P., Doco, T., Darvill, A.G. and Albersheim P.** (1996) Rhamnogalacturonan-II, a pectic polysaccharide in the walls of growing plant cell, forms a dimer that is covalently cross-linked by a borate ester. *J. Biol. Chem.* **271**, 22923–22930.
- O'Neill, M.A., Eberhard, S., Albersheim, P. and Darvill, A.G.** (2001) Requirement of borate cross-linking of cell wall rhamnogalacturonan II for *Arabidopsis* growth. *Science* **294**, 846–849.
- O'Neill, M.A., Ishii, T., Albersheim, P. and Darvill, A.G.** (2004) Rhamnogalacturonan II: structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. *Ann. Rev. Plant Biol.* **55**, 109–139.
- Pandey, J.L., Wang, B., Diehl, B.G., Richard, T.L., Chen, G., Anderson, C.T.** (2015) A versatile click-compatible monolignol probe to study lignin deposition in plant cell walls. *PLoS One.* **10**(4):e0121334.
- Rostovtsev, V.V., Green, L.G., Fokin, V.V. and Sharpless, K.B.** (2002) A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective “ligation” of Azides and terminal alkynes *Angew. Chem.* **41**, 2596–2599.
- Royo, J., Gomez, E and Hueros, G.** (2000) A maize homologue of the bacterial CMP-Kdo synthetases: similar pathways operate in plants and bacteria for the activation of Kdo prior to its incorporation into cellular envelopes. *J. Biol. Chem.* **275**: 24993-24999.
- Smyth, K.M., Mikolajek, H., Werner, J.M. and Marchant A.** (2013) 2 β -deoxy-Kdo is an inhibitor of the *Arabidopsis thaliana* CMP-2-keto-3-deoxymanno-octulosonic acid synthetase, the enzyme required for activation of Kdo prior to incorporation into rhamnogalacturonan II. *Mol Plant* **6**, 981–984.
- Tornøe, C.W., Christensen, C. and Meldal, M.** (2002) Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regiospecific copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *J. Org. Chem.* **67**, 3057–3064.
- Tobimatsu, Y., Van de Wouwer, D., Allen, E., Kumpf, R., Vanholme, B., Boerjan, W. and Ralph J.** (2014) A click chemistry strategy for visualization of plant cell wall lignification. *Chem. Commun.*, **50**, 12262-12265.
- Voxeur, A., Gilbert, L., Rihouey, C., Driouich, A., Rothan, C., Baldet, P., and Lerouge, P.** (2011) Silencing of the GDP-D-mannose 3,5-epimerase affects the structure and cross-linking of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II and plant growth in tomato. *J. Biol. Chem.*, **286**, 8014-8020
- Williams, M.N., Freshour, G., Darvill, A.G., Albersheim, P. and Hahn, M.G.** (1996) An antibody Fab selected from a recombinant phage display library detects deesterified pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II in plant cells. *Plant Cell*, **8**, 673–685.
- Zhu, C., Ganguly, A., Baskin, T., McClosky, D. D., Anderson, C. T., Foster, C., Meunier, K. A., Okamoto, R., Berg, H. and Dixit, R.** (2015) The FRA1 kinesin contributes to

cortical microtubule-mediated trafficking of cell wall components. *Plant Physiol.*, **167**, 780–792.

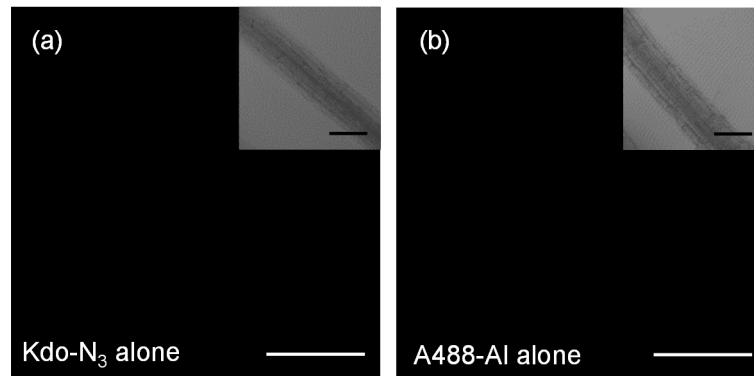
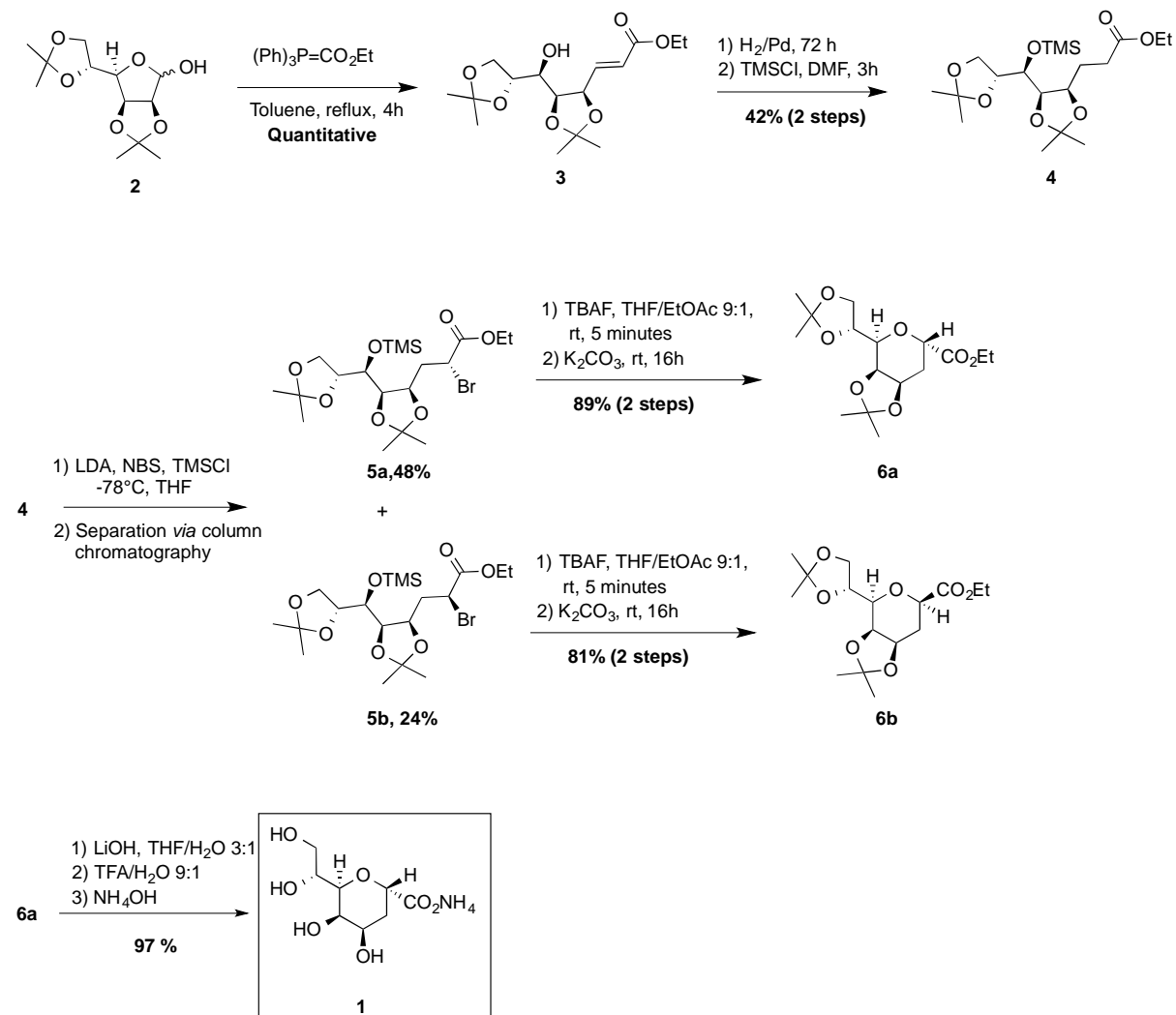


Figure S1 : Control experiments for Kdo-N₃ labelling.

Incubation of seedlings with 50 μM Kdo-N₃ alone (a) or 0.1 μM Alexa Fluor[®] 488-alkyne alone (b) does not label the root cells. Scale bars 100 μm .

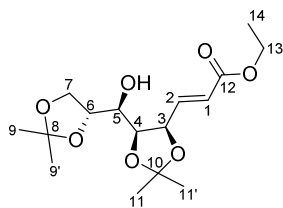
Methods S1: Synthesis of 2-deoxy-Kdo 1

1) Synthetic scheme



Synthesis of ester 3

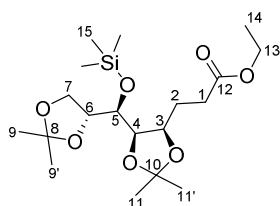
A solution of 2,3,5,6-di-*O*-isopropylidene- α -D-mannofuranose **2** (4.2 g, 16.3 mmol, 1 equiv.) and (carbethoxymethylene)triphenylphosphorane (6.8 g, 19.5 mmol, 1.2 equiv.) in toluene was stirred under reflux for 4 hours. The reaction mixture was then filtered through a pad of silica and concentrated under *vacuo*. Purification *via* column chromatography (pentane/EtOAc 7:3) afforded compound **3** as colourless oil (5.6 g, quantitative yield, E/Z 94:6). An analytical sample was purified by HPLC (hexane/EtOAc 75:25) for characterisation purpose (E/Z 98:2).



¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 7.07 (1H, dd, ³J_{HH} 15.7 Hz, ³J_{HH} 6.1 Hz, H₂), 6.10 (1H, dd, ³J_{HH} 15.7 Hz, ³J_{HH} 1.5 Hz, H₁), 4.83 (1H, ddd, ³J_{HH} 7.5 Hz, ³J_{HH} 6.2 Hz, ³J_{HH} 1.5 Hz, H₃), 4.46 (1H, dd, ³J_{HH} 7.5 Hz, ³J_{HH} 2.1 Hz, H₄), 4.21 (2H, app. qd, *J* 7.1 Hz, *J* 1.8 Hz, H₁₃), 4.14 – 4.07 (1H, m, H₇), 4.03 – 3.96 (2H, m, H₆, H₇), 3.49 – 3.40 (1H, m with the presence of *J* 7.8 Hz, *J* 2.2 Hz, H₅), 2.15 (1H, d, ³J_{HH} 7.6 Hz, OH₅), 1.55 (3H, s, H₉, H_{9'}, H₁₁ or H_{11'}), 1.42 (3H, s, H₉, H_{9'}, H₁₁ or H_{11'}), 1.41 (3H, s, H₉, H_{9'}, H₁₁ or H_{11'}), 1.35 (3H, s, (3 H, s, H₉, H_{9'}, H₁₁ or H_{11'}), 1.30 (3H, t, ³J_{HH} 7.1 Hz, H₁₄) ppm; **¹³C NMR** δ (100 MHz, CDCl₃) 165.7 (C₁₂), 143.2 (C₁), 123.6 (C₂), 109.5 (C₈ or C₁₀), 109.3 (C₈ or C₁₀), 77.4 (C₄), 76.7 (C₃), 76.1 (C₆), 70.5 (C₅), 67.2 (C₇), 60.6 (C₁₃), 26.75 (C₉ or C_{9'} or C₁₀ or C₁₁), 26.72 (C₉ or C_{9'} or C₁₀ or C₁₁), 25.2 (C₉ or C_{9'} or C₁₀ or C₁₁), 24.8 (C₉ or C_{9'} or C₁₀ or C₁₁), 14.2 (C₁₄) ppm. NMR spectra correspond to the reported data.¹

Synthesis of 4

Compound **3** (5.6 g, 16.3 mmol, 1 equiv.) was dissolved in EtOAc (100 mL). Pd/C (10% wt, 1.0 g, 1.0 mmol, 6 mol%) was added and the resultant mixture was flushed with H₂. Stirring under H₂ at r.t. was continued for 48 hours before the mixture was filtered through a pad of silica and concentrated *in vacuo*, to give 4.66 g of crude mixture, which was used in the next step without any purification. The mixture (4.66 g, 14 mmol, 1 equiv.) was then dissolved in DMF (53 mL) and imidazole (1.1 g, 16.1 mmol, 1.15 equiv.) as well as TMSCl (1.8 mL, 14.1 mmol, 1.01 equiv.) was added at 0 °C. The mixture was stirred for 2 hours at rt and an additional amount of TMSCl (850 μL, 7.0 mmol, 0.5 equiv.) was added. The mixture was then partitioned between H₂O (100 mL) and EtOAc (100 mL). The aqueous phase was extracted with EtOAc (3*100 mL). Organic phases were combined, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Purification *via* column chromatography (pentane/acetone 95:5) afforded compound **4** as a pale oil (2,8 g, 42% over 2 steps).

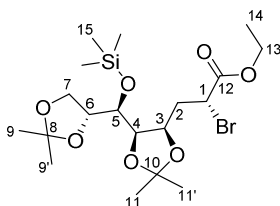


[α]_D 52.1 (c 1.1, CHCl₃, 19 °C (litt. 38.7 (c 1.04, CHCl₃, T not mentioned)²); **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ 4.16 – 4.03 (2H, m, H₃, H₇), 4.13 (1H, q, ³J_{HH} 7.3 Hz, H₁₃), 4.00 – 3.90 (2H, m, H₄ or H₅, H₆), 3.90 – 3.82 (2H, m, H₄ or H₅, H₇), 2.54 (1H, ddd, ²J_{HH} 16.1 Hz, ³J_{HH} 9.1 Hz, ³J_{HH} 5.6 Hz, H₁), 2.36 (1 H, ddd, ²J_{HH} 16.0 Hz, ³J_{HH} 9.2, ³J_{HH} 6.9 Hz, H₁), 1.99 – 1.88 (1H, m, H₂), 1.82 – 1.70 (1H, m, H₂), 1.44 (3H, s, H₉, H_{9'}, H₁₁ or H_{11'}), 1.41 (3H, s, H₉, H_{9'}, H₁₁ or H_{11'}), 1.34 (3H, s, H₉, H_{9'}, H₁₁ or H_{11'}), 1.32 (3H, s, H₉, H_{9'}, H₁₁ or H_{11'}), 1.26 (3H, t, ³J_{HH} 7.1 Hz, H₁₄), 0.15 (9 H, s, H₁₅) ppm; **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃) δ 173.4 (C₁₂), 109.4 (C₈ or C₁₀), 107.7 (C₈ or C₁₀), 79.86 (C₄ or C₅ or C₆), 77.02 (C₄ or C₅ or C₆ (DEPT 45)), 76.6(C₃), 71.8 (C₄ or C₅ or C₆), 67.0 (C₇), 60.3 (C₁₃), 30.7 (C₁), 28.1 (C₉ or C_{9'} or C₁₀ or C₁₁), 26.2 (2C, C₉ or C_{9'} or C₁₀ or C₁₁), 26.1 (C₂), 25.2 (C₉ or C_{9'} or C₁₀ or C₁₁), 12.4 (C₁₄), 0.7 (C₁₅) ppm. Only ¹³C NMR reported in the literature, our data match the literature data.³

Synthesis of 5a and 5b

To a stirred solution of LDA (prepared from nBuLi (1.6 M in hexanes, 1.7 mmol, 1.3 equiv.) and diisopropylamine (240 μ L, 1.7 mmol, 1.3 equiv.) in THF (5 mL) at -78 $^{\circ}$ C) was added a solution of TMSCl (300 μ L, 2.3 mmol, 1.8 equiv.) and compound **4** in THF (mL) at -78 $^{\circ}$ C. The mixture was stirred for 1 hour at this temperature, after which *N*-bromosuccinimide (276 mg, 1.56 mmol, 1.2 equiv.) was added portionwise. The resulting mixture was then stirred at 0° C for 1 hour, then quenched with NaHCO₃ (5 mL). The mixture was then partitioned between EtOAc (10 mL) and H₂O (10 mL). The aqueous phase was extracted with EtOAc (3*10 mL). Organic phases were combined, dried over MgSO₄ and concentrated in *vacuo*. Purification *via* column chromatography (pentane/acetone 95:5/85:15) afforded compound **5a** as a pale oil (299 mg, 48%) and **5b** as a pale oil (150 mg, 24%).

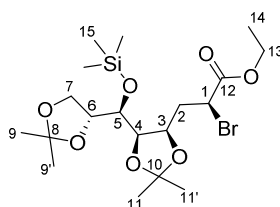
Compound 5a



[α]_D 72.7 (c 0.77, CHCl₃, 21 $^{\circ}$ C); **IR** (neat) 2979 (w, br), 1739 (m), 1372 (m), 1247 (s), 1213 (s), 1151 (s), 1096 (s) cm⁻¹; **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ 4.49 (1H, dd, ³*J*_{HH} 11.0 Hz, ³*J*_{HH} 3.4 Hz, H₁), 4.39 (1H, ddd, ³*J*_{HH} 10.8 Hz, ³*J*_{HH} 5.2 Hz, ³*J*_{HH} 2.1 Hz, H₃), 4.24 (2H, q, ³*J*_{HH} 7.3 Hz, H₁₃), 4.12 (1H, dd, ²*J*_{HH} 8.2 Hz, ³*J*_{HH} 6.5 Hz, H₇), 4.04 (1H, dd, ³*J*_{HH} 8.4 Hz, ³*J*_{HH} 5.3 Hz, H₄), 3.96 (1H, dd, ³*J*_{HH} 13.5 Hz, ³*J*_{HH} 7.0 Hz, H₆), 3.81 (1H, dd, ²*J*_{HH} 8.1 Hz, ³*J*_{HH} 7.1 Hz, H_{7'}), 3.77 – 3.70 (1 H, m, H₅), 2.33 (1H, ddd, ²*J*_{HH} 14.2 Hz, ³*J*_{HH} 11.0 Hz, ³*J*_{HH} 2.2 Hz, H₂), 2.05 (1 H, ddd, ²*J*_{HH} 14.2 Hz, ³*J*_{HH} 10.9, ³*J*_{HH} 3.2 Hz, H_{2'}), 1.45 (3H, s, H₉, H_{9'}, H₁₁ or H_{11'}), 1.43 (3H, s, H₉, H_{9'}, H₁₁ or H_{11'}), 1.37 – 1.33 (6H, m, H₉, H_{9'}, H₁₁ or H_{11'}), 1.31 (3H, t, ³*J*_{HH} 7.2 Hz, H₁₄), 0.14 (9 H, s, H₁₅); **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃) δ 170.0 (C₁₂), 110.0 (C₈ or C₁₀), 108.0 (C₈ or C₁₀), 80.3 (C₄), 77.0 (C₆), 74.7 (C₃), 72.2 (C₅), 67.9 (C₇), 62.0 (C₁₃), 44.3 (C₁), 35.4 (C₂), 28.3 (C₉ or C_{9'} or C₁₀ or C₁₁), 26.3 (C₉ or C_{9'} or C₁₀ or C₁₁), 26.1 (C₉ or C_{9'} or C₁₀ or C₁₁), 25.2 (C₉ or C_{9'} or C₁₀ or C₁₁), 13.9 (C₁₄), 0.7 (C₁₅) ppm; **MS** (ESI+) (m/z) 505 [M(⁷⁹Br) + Na]⁺; **HRMS** (ESI+) for C₁₉H₃₅⁷⁹BrO₇Si [M+Na]⁺ calcd 505.1228, found 505.1235.

The configuration at C2 was assigned through deduction following assignment of the relative configuration of the ring-closed product (next step).

Compound 5b



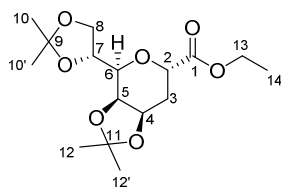
[α]_D 27.1 (c 0.64, CHCl₃, 21 $^{\circ}$ C); **IR** (neat) 2983 (w, br), 1742 (s), 1372 (m), 1250 (s), 1221 (s), 1152 (s), 1105 (s) cm⁻¹; **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ 4.31 – 4.17 (1H, m, H₁₃), 4.11 – 4.02 (1H, m, H₃), 4.08 (1H, dd, ²*J*_{HH} 8.1 Hz, ³*J*_{HH} 6.4 Hz, H₇), 3.99 – 3.91 (2H, m, H₄, H₆), 3.87 – 3.81 (1H, m with the presence of *J* 7.6 Hz, H_{7'}), 3.78 (1H, dd, ³*J*_{HH} 8.0, ³*J*_{HH} 6.7 Hz, H₅), 2.58 (1H, ddd, ²*J*_{HH} 13.4 Hz, ³*J*_{HH} 11.3 Hz, ³*J*_{HH} 2.5 Hz, H₂), 2.11 (1H, ddd, ²*J*_{HH} 13.3 Hz, ³*J*_{HH} 11.4, ³*J*_{HH} 2.5 Hz, H_{2'}), 1.47 (3H, s, H₉, H_{9'}, H₁₁ or H_{11'}), 1.46 (3H, s, H₉, H_{9'}, H₁₁ or H_{11'}), 1.36 (3H, m, H₉, H_{9'}, H₁₁ or H_{11'}), 1.32 (3H, m, H₉, H_{9'}, H₁₁ or H_{11'}), 1.31 (3H, t, ³*J*_{HH} 7.0 Hz, H₁₄), 0.16 (9H, s, H₁₅) ppm; **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃) δ 169.4

(C₁₂), 109.8 (C₈ or C₁₀), 108.1 (C₈ or C₁₀), 80.1 (C₄ or C₆), 76.9 (C₆ or C₄), 74.7 (C₃), 71.9 (C₅), 67.3 (C₇), 61.9 (C₁₃), 41.4 (C₁), 37.0 (C₂), 28.3 (C₉ or C_{9'} or C₁₀ or C₁₁), 26.2 (C₉ or C_{9'} or C₁₀ or C₁₁), 26.0 (C₉ or C_{9'} or C₁₀ or C₁₁), 25.3 (C₉ or C_{9'} or C₁₀ or C₁₁), 14.0 (C₁₄), 0.7 (C₁₅) ppm. **MS** (ESI+) (m/z) 505 [M(⁷⁹Br) + Na]⁺; **HRMS** (ESI+) for for C₁₉H₃₅⁷⁹BrO₇Si [M+Na]⁺ calcd 505.1228, found 505.1235.

The configuration at C2 was assigned through deduction following assignment of the relative configuration of the ring-closed product (next step).

Synthesis of protected 2β-deoxy-Kdo 6a

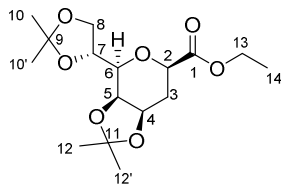
To a solution of **5a** (278 mg, 0.57 mmol, 1 equiv.) in EtOAc/EtOH 9:1 (5.7 mL) was added TBAF (1M in THF, 520 μL, 0.52 mmol, 0.9 equiv.) dropwise. The mixture was stirred at RT for 5 minutes, after which K₂CO₃ (336 mg, 1.7 mmol, 3 equiv.) was added. The resulting suspension was stirred for 16 hours, then partitioned between H₂O (10 mL) and EtOAc (10 mL). Aqueous phase was extracted with EtOAc (3*10 mL). The organic phases were combined, dried over MgSO₄ and concentrated. Purification *via* column chromatography (pentane/Et₂O 6:4) followed by preparative HPLC (hexane/EtOAc 8:2) afforded compound **6a** as a colourless oil (168 mg, 89%).



[α]_D -45.7 (c 1.51, CHCl₃, 21 °C (lit. -43.8 (c 1.07, CHCl₃, T not mentioned)²); **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ 4.59 (1H, ddd appeared as dt, ³J_{HH} 7.8 Hz, ³J_{HH} 2.9 Hz, H₄), 4.53 (1H, dd, ³J_{HH} 11.4 Hz, ³J_{HH} 6.0 Hz, H₂), 4.34 (1H, dd, ³J_{HH} 8.1 Hz, ³J_{HH} 1.5 Hz, H₅), 4.26 – 4.17 (3H, m, H₁₃, H₇ or H₈), 4.16 – 4.07 (1H, H₇ or H₈), 3.51 (1H, dd, ³J_{HH} 8.1 Hz, ³J_{HH} 1.5 Hz, H₆), 2.31 (1H, ddd, ²J_{HH} 15.0 Hz, ³J_{HH} 5.9 Hz, ³J_{HH} 2.7 Hz, H₃), 1.86 (1 H, ddd, ²J_{HH} 14.7 Hz, ³J_{HH} 11.7, ³J_{HH} 2.8 Hz, H_{3'}), 1.49 (3H, s, H₁₀ or H_{10'} or H₁₂ or H_{12'}), 1.42 (3H, s, H₁₀ or H_{10'} or H₁₂ or H_{12'}), 1.38 (3H, s, H₁₀ or H_{10'} or H₁₂ or H_{12'}), 1.37 (3H, s, H₁₀ or H_{10'} or H₁₂ or H_{12'}), 1.29 (3H, t, ³J_{HH} 7.2 Hz, H₁₄) ppm; **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃) δ 172.9 (C₁), 109.4 (C₉ or C₁₁), 109.3 (C₉ or C₁₁), 73.7 (C₇), 72.8 (C₆), 72.2 (C₅), 69.8 (C₂), 68.4 (C₄), 67.2 (C₈), 61.0 (C₁₃), 27.0 (C₁₀ or C_{10'} or C₁₁ or C_{11'}), 26.7 (C₁₀ or C_{10'} or C₁₁ or C_{11'}), 26.2 (C₃), 25.1 (C₁₀ or C_{10'} or C₁₁ or C_{11'}), 24.9 (C₁₀ or C_{10'} or C₁₁ or C_{11'}), 14.2 (C₁₄) ppm. NMR spectra correspond with the reported data.⁴

Synthesis of protected 2α-deoxy-Kdo 6b

To a solution of **5b** (130 mg, 0.27 mmol, 1 equiv.) in EtOAc/EtOH 9:1 (2.7 mL) was added TBAF (1M in THF, 240 μL, 0.24 mmol, 0.9 equiv.) dropwise. The mixture was stirred at rt for 5 minutes, after which K₂CO₃ (111 mg, 0.8 mmol, 3 equiv.) was added. The resulting suspension was stirred for 16 hours, then partitioned between H₂O (10 mL) and EtOAc (10 mL). Aqueous phase was extracted with EtOAc (3*10 mL). Organic phases were combined, dried over MgSO₄ and concentrated. Purification *via* column chromatography (pentane/Et₂O 45:55) afforded compound **6b** as a white solid (72 mg, 81%).

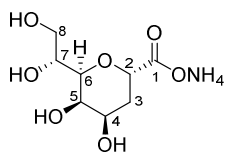


$[\alpha]_D^{25}$ 35.8 ((0.33, CHCl₃, 20 °C) Lit. 41.1 (c 0.18, CHCl₃, 20 °C)⁴); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.44 – 4.32 (2H, m, H₄, H₇), 4.29 – 4.15 (3H, m, H₅, H₁₃), 4.14 – 4.10 (2H, m, H₈, H_{8'}), 4.03 (1H, dd, ³J_{HH} 9.1 Hz, ³J_{HH} 3.9 Hz, H₂), 3.55 (1H, dd, ³J_{HH} 7.8 Hz, ³J_{HH} 2.0 Hz, H₆), 2.18 (1H, ddd, ²J_{HH} 13.9 Hz, ³J_{HH} 5.4 Hz, ³J_{HH} 4.2 Hz, H₃), 1.99 (1 H, ddd, ²J_{HH} 13.9 Hz, ³J_{HH} 9.1 Hz, ³J_{HH} 8.1 Hz, H_{3'}), 1.50 (3H, s, H₁₀ or H_{10'} or H₁₂ or H_{12'}), 1.44 (3H, s, H₁₀ or H_{10'} or H₁₂ or H_{12'}), 1.38 (3H, s, H₁₀ or H_{10'} or H₁₂ or H_{12'}), 1.37 (3H, s, H₁₀ or H_{10'} or H₁₂ or H_{12'}), 1.29 (3H, t, ³J_{HH} 7.1 Hz, H₁₄) ppm; ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 170.6 (C₁), 109.6 (C₉ or C₁₁), 109.3 (C₉ or C₁₁), 75.8 (C₇), 74.3 (C₆), 72.5 (C₅), 71.3 (C₂), 71.2 (C₄), 66.9 (C₈), 61.1 (C₁₃), 30.6 (C₃), 27.5 (C₁₀ or C_{10'} or C₁₁ or C_{11'}), 27.0 (C₁₀ or C_{10'} or C₁₁ or C_{11'}), 26.0 (C₁₀ or C_{10'} or C₁₁ or C_{11'}), 25.4 (C₁₀ or C_{10'} or C₁₁ or C_{11'}), 14.1 (C₁₄) ppm. NMR spectra correspond with the reported data.⁴

Following comparison of the optical rotation data, and of the chemical shift values of H₂, H₃, and H_{3'}, the relative configuration of **5a** and **5b** could be unambiguously established.

Synthesis of 2β-deoxy-Kdo 1

To a solution of **6a** (49 mg, 0.15 mmol, 1 equiv.) in THF/H₂O (3:1, 6 mL) was added LiOH (7 mg, 0.3 mmol, 2 equiv.) at r.t. The mixture was stirred at r.t for 90 minutes. HCl (2M) was then added to until pH 1, and the resulting mixture was stirred for 5 minutes. The organic phase was extracted with EtOAc (5*10 mL), dried over MgSO₄ and concentrated in *vacuo*, to give 46 mg of crude acid, which was dissolved in TFA/H₂O (9:1, 6 mL) and stirred for 90 minutes. The mixture was then concentrated in *vacuo*, co-evaporated with toluene, dissolved in H₂O and filtered through cotton wool. The resulting oil was freeze-dried for 48 hours, to give 33 mg of acid (isolated with 1 mol% of TFA (fluorobenzene used as internal reference)). The acid was then dissolved in NH₄aq (2 mL), concentrated in *vacuo* and freeze-dried for 48 hours, to give the 2β-deoxy Kdo **1** as a white solid (35 mg, 97% over 2 steps).



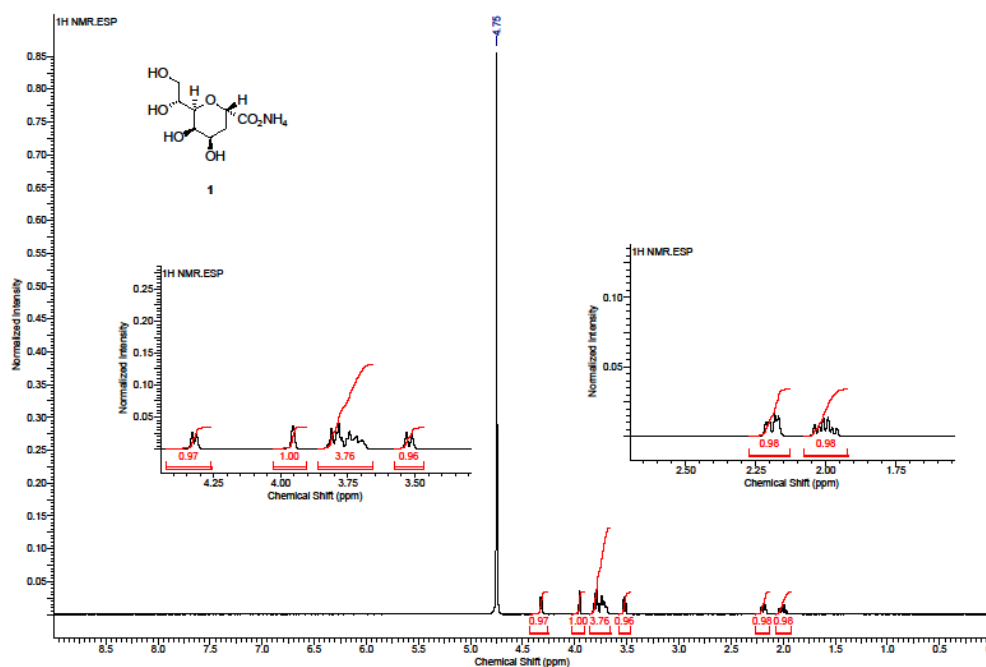
$[\alpha]_D^{25}$ 52.1 ((c 0.3, H₂O, 24 °C)) Litt 68.6 (c 1.02, CHCl₃, 20 °C)⁴); ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 4.28 (1H, d, ³J_{HH} 6.6 Hz, H₂), 3.91 (1H, br. s, H₅), 3.81 – 3.57 (4H, m, H₄, H₇, H₈, H_{8'}), 3.47 (1H, d, ³J_{HH} 8.3 Hz, H₆), 2.14 (1H, dd, ²J_{HH} 13.0 Hz, ³J_{HH} 4.9 Hz, H₃), 1.95 (1 H, ddd appeared as td, ²J_{HH}, ³J_{HH} 12.6 Hz, ³J_{HH} 6.8 Hz, H_{3'}) ppm; ¹³C NMR (100 MHz, D₂O) δ 178.6 (C₁), 74.2 (C₂), 73.8 (C₆), 69.1 (C₇), 66.9 (C₅), 66.3 (C₄), 64.0 (C₈), 28.5 (C₃) ppm. NMR spectra correspond with the reported data.⁴

2) References

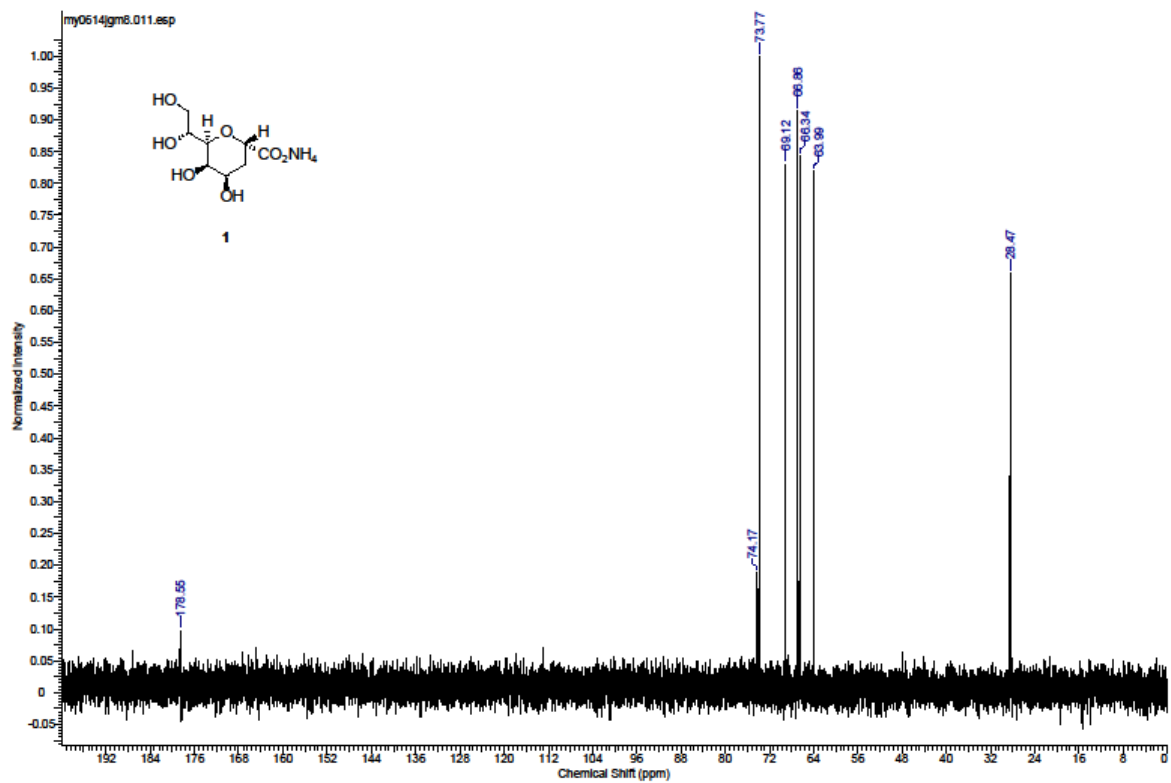
- (1) Martinková, M.; Pomikalová, K.; Gonda, J.; Vilková, M. *Tetrahedron* **2013**, *69*, 8228.
- (2) Claesson, A. *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 4414.
- (3) Boons, G. J. P. H.; van der Klein, P. A. M.; van der Marel, G. A.; van Boom, J. H. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1990**, *109*, 273.
- (4) López-Herrera, F. J.; Sarabia-García, F. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 3325.

3) Copy of spectra for 1

^1H NMR (D_2O , 400 MHz)



^{13}C NMR (D_2O , 100 MHz)



Article 3. L'inhibition de la fucosylation des composés pariétaux par traitement au 2-fluoro 2-désoxy fucose provoque un défaut de l'élongation racinaire.

Dumont M, Lehner A, Bardor M, Burel C, Vauzeilles B, Lerouxel O, Anderson CT, Mollet JC, Lerouge P. Inhibition of fucosylation of cell wall components with 2-fluoro 2-deoxy fucose induces defects in root cell elongation.

Article en cours de rédaction pour soumission à *Plant Journal*.

Les glycosyltransférases (GTs), véritables ouvrières dans la synthèse de la paroi, sont les enzymes responsables du transfert de chaque monosaccharide, sous sa forme activée, sur un polysaccharide en cours de synthèse. Chaque liaison glycosidique qui relie deux monosaccharides implique une GT spécifique. Ainsi, 22 GTs seraient nécessaires à la synthèse du RG-II, mais seule une xylosyltransférase a été caractérisée (Liu *et al.*, 2011) et est responsable du transfert du xylose sur la chaîne A.

En général, la fonction des composés pariétaux peut être évaluée par génétique fonctionnelle en ciblant les gènes codant les GTs. Concernant le RG-II, puisque les mutations affectant la synthèse de celui-ci génèrent des plantes non viables ou présentant des défauts de croissance sévères (Liu *et al.*, 2011), une stratégie alternative a été testée. Plusieurs études rapportent le potentiel inhibiteur des monosaccharides fluorés chez les cellules animales et chez les plantes, que ce soit au niveau de la glycosylation de protéines (Rillahan *et al.*, 2012) ou la synthèse de callose (Jaffe & Leopold, 1984). Après un premier screening de l'effet de différents sucres-fluorés sur la croissance caulinaire et racinaire d'*Arabidopsis*, nous avons focalisé notre étude sur le 2-fluoro 2-désoxy L-fucose (2F-Fuc). L'article qui suit présente une analyse phénotypique détaillée de l'effet de ce sucre fluoré, à faible concentration, sur la croissance racinaire. La croissance des racines fortement réduite serait due à une inhibition de l'élongation cellulaire tandis que la division des cellules du méristème ne serait pas affectée. En parallèle, une étude biochimique des principaux composés pariétaux fucosylés démontre que le 2F-Fuc inhibe les FucTs impliquées dans la synthèse des glycoprotéines et du XyG. Cependant, compte tenu que des mutants affectés dans la fucosylation du XyG et des glycoprotéines ne présentent pas de défaut de croissance, nous en avons conclu que l'absence de fucose de ces composés n'était pas responsable du phénotype observé en présence d'inhibiteur (von Schaewen *et al.*, 1993; Vanzin *et al.*, 2002 ; Liang *et al.*, 2013). L'action partiellement restauratrice du

phénotype par l'ajout de bore nous a alors conduits à analyser l'état de dimérisation du RG-II. Le profil électrophorétique du RG-II a montré que des concentrations croissantes de 2F-Fuc inhibent la dimérisation du RG-II voire sa synthèse. En effet, l'apparition d'oligosaccharides de poids moléculaire plus faibles que le monomère de RG-II pourrait traduire la présence de chaînes tronquées de RG-II en raison de l'absence des résidus fucose sur la chaîne A et 2-O-méthyl-fucose sur la chaîne B. Cette hypothèse est soutenue par la théorie que l'assemblage des chaînes latérales du RG-II se ferait de manière séquentielle (soit par transfert des monosaccharides directement sur le squelette d'HG ou par transfert « en bloc » des chaînes préalablement formées sur un intermédiaire lipidique) et que la synthèse incomplète d'une chaîne pourrait contrarier le transfert de la chaîne suivante. En parallèle, une approche par « click chemistry » a été menée sur des plantules traitées au 2F-Fuc et a conforté l'action inhibitrice du 2F-Fuc sur la synthèse du RG-II puisque ces plantules ne semblent pas incorporer le Kdo-N₃ dans leurs parois cellulaires.

L'ajout de bore dans le milieu de culture permet de restaurer, en partie, le phénotype racinaire. Une concentration trop forte en 2F-Fuc semble affecter irréversiblement la structure du polysaccharide qui n'assure plus son rôle de molécule fixatrice du bore dans l'apoplasme. Cette étude a permis de mettre en avant le rôle essentiel du RG-II dans l'élongation cellulaire et de comprendre pourquoi ce composé pectique a été conservé au cours de l'évolution des plantes malgré le coût entropique nécessaire à sa synthèse, impliquant de nombreuses enzymes. D'autre part, les résultats obtenus nous conduisent à considérer un autre aspect du complexe bore lié au RG-II. Son rôle dans l'intégrité structural n'est plus à démontrer mais son aspect signalétique ressort davantage. Ainsi, des cascades de transduction intracellulaires pourraient être régulées par le taux de bore lié au RG-II dans la paroi afin de moduler l'architecture de la racine en réponse aux conditions de stress environnemental.

Inhibition of fucosylation of cell wall components by 2-fluoro 2-deoxy fucose induces defects in root cell elongation.

Marie Dumont¹, Arnaud Lehner¹, Muriel Bardor¹, Carole Burel¹, Boris Vauzeilles², Olivier Lerouxel³, Charles T. Anderson⁴, Jean-Claude Mollet¹ and Patrice Lerouge^{1*}

¹ Laboratoire Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale, EA 4358, IRIB, VASI, Normandie Université 76821 Mont-Saint-Aignan, France

² Institut de chimie moléculaire et des matériaux d'Orsay (ICMMO) UMR CNRS 8182, Université de Paris Sud 91405 Orsay ; Institut de chimie des substances naturelles (ICSN) UPR CNRS 2301, 91198 Gif-sur-Yvette, France ; Click4Tag, Zone Luminy Biotech, Case 922, 163 avenue de Luminy, 13009 Marseille, France

³ Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales (CERMAV) – CNRS BP 53, 38041 Grenoble cedex 9, France

⁴ Department of Biology and Center for Lignocellulose Structure and Formation, The Pennsylvania State University, University Park, Pennsylvania, USA

*For correspondence. E-mail : patrice.lerouge@univ-rouen.fr

Running title : Inhibition of plant cell wall fucosylation and root growth

Key words : *Arabidopsis* ; 2-fluoro 2 deoxy L-fucose, cell elongation, rhamnogalacturonan-II, boron, root

ABSTRACT

Screening of commercially available fluoro monosaccharides as putative growth inhibitors revealed that 2-fluoro 2-deoxy L-fucose (2F-Fuc) is able to reduce the root growth at micromolar concentrations. Chemical analysis of cell wall polysaccharides and glycoproteins

demonstrated that fucosylation of xyloglucans and of *N*-linked glycans is fully inhibited by 10 μ M 2F-Fuc in *Arabidopsis* seedling roots but that this inhibition is not responsible for the observed root developmental phenotype. Inhibition of fucosylation of cell wall polysaccharides also affected pectic rhamnogalacturonan-II (RG-II). At low concentrations, 2F-Fuc induced a decrease in RG-II dimerization. This phenotype was partially restored by boric acid addition, which suggested that the growth phenotype was due to a RG-II dimerization deficiency. Closer investigation of the growth phenotype demonstrated that cell division is not affected by 2F-Fuc treatments. In contrast, the inhibitor suppressed elongation of root cells and promoted the emergence of adventitious roots. This study further emphasizes the importance of RG-II in cell elongation and the utility of glycosyltransferase inhibitors as new tools for studying the functions of cell wall polysaccharides in plant development. Moreover, supplementation experiments with borate suggest that boron function in plants might not be restricted to RG-II cross-linking, but might also be a sensor to control cell elongation and/or cell wall integrity.

INTRODUCTION

In plants, the primary wall surrounding each cell is made of several structural polymers. Analyses of a wide range of plant species have revealed that all cell walls contain three classes of structural polysaccharides: cellulose, hemicelluloses and pectins as well as structural proteins and glycoproteins (Albersheim *et al.*, 2010). The plant cell wall is made of at least 13 different monosaccharides connected together by a variety of glycosidic linkages, forming a complex matrix of polysaccharides. The synthesis of cell wall polysaccharides is performed by membrane-bound polysaccharide synthetases and glycosyltransferases (GTs). GTs are enzymes that allow the transfer of single sugars from nucleotide sugar donors onto specific acceptors. To date, 564 GT sequences divided in 45 families have been identified in the *Arabidopsis thaliana* genome (<http://www.cazy.org/e1.html>) without taking into account the ones that are

not listed in the CAZy (carbohydrate-active enzymes) database and seem to behave as GTs (Keegstra and Raikhel, 2001; Scheible and Pauly, 2004; Voxeur *et al.*, 2012). Reverse genetic approaches targeting GT sequences have provided numerous data concerning the function of cell wall polysaccharides in plant development in *Arabidopsis* and other plant species (Bouton *et al.*, 2002; Vanzin *et al.*, 2002). However, for some cell wall polymers such as rhamnogalacturonan II (RG-II), mutations affecting GTs or enzymes involved in the biosynthesis of RG-II-specific monosaccharides are lethal or induce very strong developmental phenotypes (O'Neill *et al.*, 2001; Ahn *et al.*, 2006; Delmas *et al.*, 2008; Deng *et al.*, 2010; Dumont *et al.*, 2014). This problem can be partially overcome by studying RNAi lines instead of knock-out mutants (Voxeur *et al.*, 2011). RG-II is a low molecular weight complex polysaccharide that is composed of more than 12 glycosyl residues linked to each other by more than 22 glycosidic linkages (Bar-Peled *et al.*, 2012). RG-II contains four side chains, A to D, linked to a homogalacturonan backbone made of seven to nine α -(1-4)-galacturonic acid residues (Fig S1). Despite its complex structure, RG-II is evolutionarily conserved in the plant kingdom. It is present in the primary cell wall of all higher plants, predominantly in the form of a dimer that is cross-linked by a borate di-ester between two A side chains (O'Neill *et al.*, 1996; Kobayashi *et al.*, 1996). The lethality of knock-out lines affecting RG-II biosynthesis makes the study of its biosynthesis and function challenging. To date, only one α -(1,3)-xylosyltransferase, named RGXT, has been fully characterized. This GT is involved in the transfer of a xylose residue onto the fucose of side chain A (Egelund *et al.*, 2006; Egelund *et al.*, 2008). Other GTs such as sialic-like transferases have been postulated to attach 3-deoxy-D-lyxo-hept-2-ulosonic acid (Dha) and 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid (Kdo) to the HG backbone (Deng *et al.*, 2010; Dumont *et al.*, 2014). Nevertheless, despite numerous efforts to determine why plants need such a complex glycan molecule to ensure efficient cell wall formation and elongation, the precise function of RG-II remains unclear.

The use of modified monosaccharides, such as deoxy or fluorinated sugars, has been described as a powerful pharmacological approach for studying metabolism and physiology in prokaryotic and eukaryotic organisms (Som *et al.*, 1980; Edmonds and Peddie, 2006). After uptake from the culture medium, the sugar analogue can either compete with endogenous metabolites or inhibit enzymes. The analogue 2-deoxy-D-glucose was shown to be able to inhibit protein glycosylation (Schwarz and Datema, 1980) and, in plants, to inhibit callose production and delay gravitropism (Jaffe and Leopold, 1984). Indeed, 2-deoxy-D-glucose has been used as a selection agent for plant transformation as well as an antibiotic or herbicide (Kunze *et al.*, 2001). In *Prototheca zopfii*, a unicellular algae, deoxy glucose also inhibits β -1,4-glucan formation (Datema *et al.*, 1983). A recent study reported the use of the 2 β -deoxy-Kdo, a deoxy analogue of Kdo that is found in RG-II side chain C (Fig. S1) (Smyth *et al.*, 2013). This deoxy sugar was demonstrated to inhibit cytosolic CMP-Kdo synthase and, as a consequence, to affect RG-II biosynthesis and cause severe root growth phenotypes (Smyth *et al.*, 2013).

Replacement of hydroxyl groups by fluorine atoms makes deoxy fluoro sugars useful probes for the study of glycosyltransferase mechanisms (Burkart *et al.*, 2000). The fluorine atom has a small atomic radius with high electronegativity and ionization potential. Substitution of OH with F in a sugar does not change the overall size of the molecule but deeply affects its physical and biological properties since the C-F bond is more polar than the corresponding C-OH. After conversion into nucleotide sugars, the fluorinated analogues are able to form stable and tight complexes with enzyme binding sites. These molecules have been used in several studies as probes to study glycosyltransferase mechanisms and functions (Brown *et al.*, 2012). Recently, Rillahan *et al.* (2012) investigated two fucosyltransferase inhibitors [2-fluoro 2-deoxy L-fucose (2F-Fuc) and 6-fluoro L-fucose (6F-Fuc)] and one sialyltransferase inhibitor [3-fluoro 3-deoxy *N*-acetyl-neuraminic acid (3F-Neu5Ac)] that hamper the fucosylation and

sialylation of protein-linked glycans, respectively, in mammalian cells. The 2F-Fuc inhibitor has also been used to generate fucose-deficient antibodies (Okeley *et al.*, 2013). Other studies have reported the use of nucleotide fluoro sugars as competitive transferase inhibitors (Burkart *et al.*, 2000). In plants, the use of fluorinated sugars has received little attention to date. 2-^[18F]fluoro 2-deoxy D-glucose, a glucose analogue routinely used as a radiopharmaceutical tracer in medical imaging, has been applied to plants in order to study the real-time translocation of photosynthetic products in living plants (Hattori *et al.*, 2008) and plant defence (Ferrieri *et al.*, 2012). UDP 2-fluoro 2-deoxy D-glucuronic acid has also been used to study the enzyme mechanism of plant UDP- α -D-apiose/UDP- α -D-xylose synthase (Choi *et al.*, 2011).

In this work, we report the effects of commercially available fluoro monosaccharides on *Arabidopsis* growth. Among the compounds tested, 2F-Fuc was the most effective plant growth inhibitor and was able to arrest root elongation at micromolar concentrations. Biochemical analyses of cell wall polysaccharides showed that fucosylation of xyloglucan and of *N*-glycosylated proteins is suppressed. Moreover, defects in RG-II biosynthesis were demonstrated to be responsible for the growth phenotype observed in 2F-Fuc-treated plants.

RESULTS

Screening of fluoro sugar analogues for effects on cell elongation.

Arabidopsis seeds were sown on solid growth medium containing commercially available fluorinated sugar analogues. Seedling root and shoot elongation were investigated in

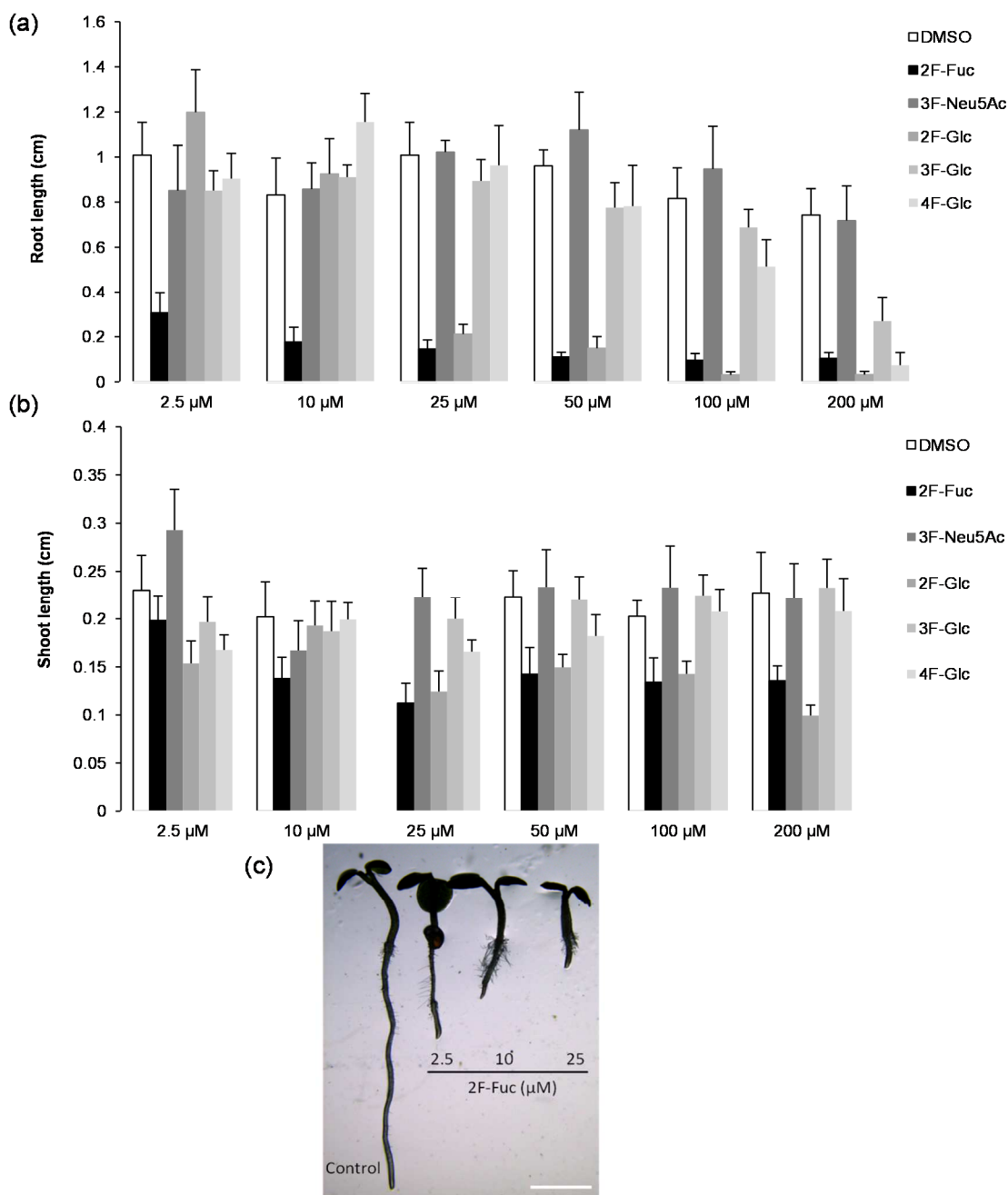


Figure 1: Effects of fluoro-monosaccharides on plant growth.

(a)-(b) Root (a) and shoot (b) length of 4-day-old *Arabidopsis* seedlings grown on medium supplemented with peracetylated 2F-Fuc, 5F-NeuAc, 2F-Glc, 3F-Glc or 4F-Glc at 2.5 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM and 200 µM. DMSO was tested at the same dilution as control. The results are given as mean ± SEM (n>10 seedlings).

(c) Four-day-old *Arabidopsis* seedlings grown on medium supplemented with peracetylated 2F-Fuc or DMSO (control). Scale bar : 0.2 cm.

the presence of deoxy fluoro D-glucose isomers differing in the position of the fluorine atom (2F-Glc, 3F-Glc and 4F-Glc), 2-fluoro 2-deoxy L-fucose (2F-Fuc) and 3-fluoro 3-deoxy *N*-acetyl D-neuraminic acid (3F-Neu5Ac) at concentrations ranging from 2.5 μ M to 200 μ M (Fig. 1a-b). Considering the structural similarity between NeuAc and Kdo, 3F-Neu5Ac was tested as a possible Kdo transferase inhibitor. Peracetylated and deacetylated fluoro sugars were tested, but effects were only observed with peracetylated sugars, indicating that the less-charged peracetylated molecules are likely to enter the cell by passive diffusion through the plasma membrane. Four-day-old *Arabidopsis* seedlings exhibited various susceptibilities to these fluorinated sugars, with growth defects being observed primarily in roots rather than shoots (Fig. 1a-b). Treatment with 3F-Neu5Ac did not induce any root growth inhibition even at a high concentration (200 μ M). Inhibition was observed with fluoro glucoses in the 25-100 μ M range with the inhibitory effect depending on the position of the fluorine atom, the most effective inhibitor being 2F-Glc. The strongest growth effect was observed with 2F-Fuc since the lowest concentration tested (2.5 μ M) of this compound was sufficient to reduce root elongation by 70%. Moreover, this effect was observed in a dose-dependent manner (Fig. 1c). Growth effects at concentrations as low as 1 μ M 2F-Fuc were also observed (data not shown). Addition of an excess fucose amount (10 mM) didn't restore a normal root growth (Fig. S4) suggesting that 2F-Fuc acts as a competitive inhibitor of GDP-Fuc synthetase as previously reported (Rillahan *et al.*, 2012). Considering the strong inhibition of root growth observed with 2F-Fuc treatment, we decided to focus on the biochemical and physiological effects induced by this sugar analogue.

2F-Fuc is a specific inhibitor of plant fucosyltransferases

Sugar analogues with 2-fluoro modifications have been investigated in animal cells for their potential inhibitory effects on glycosyltransferases. To investigate the effects of 2F-Fuc on the

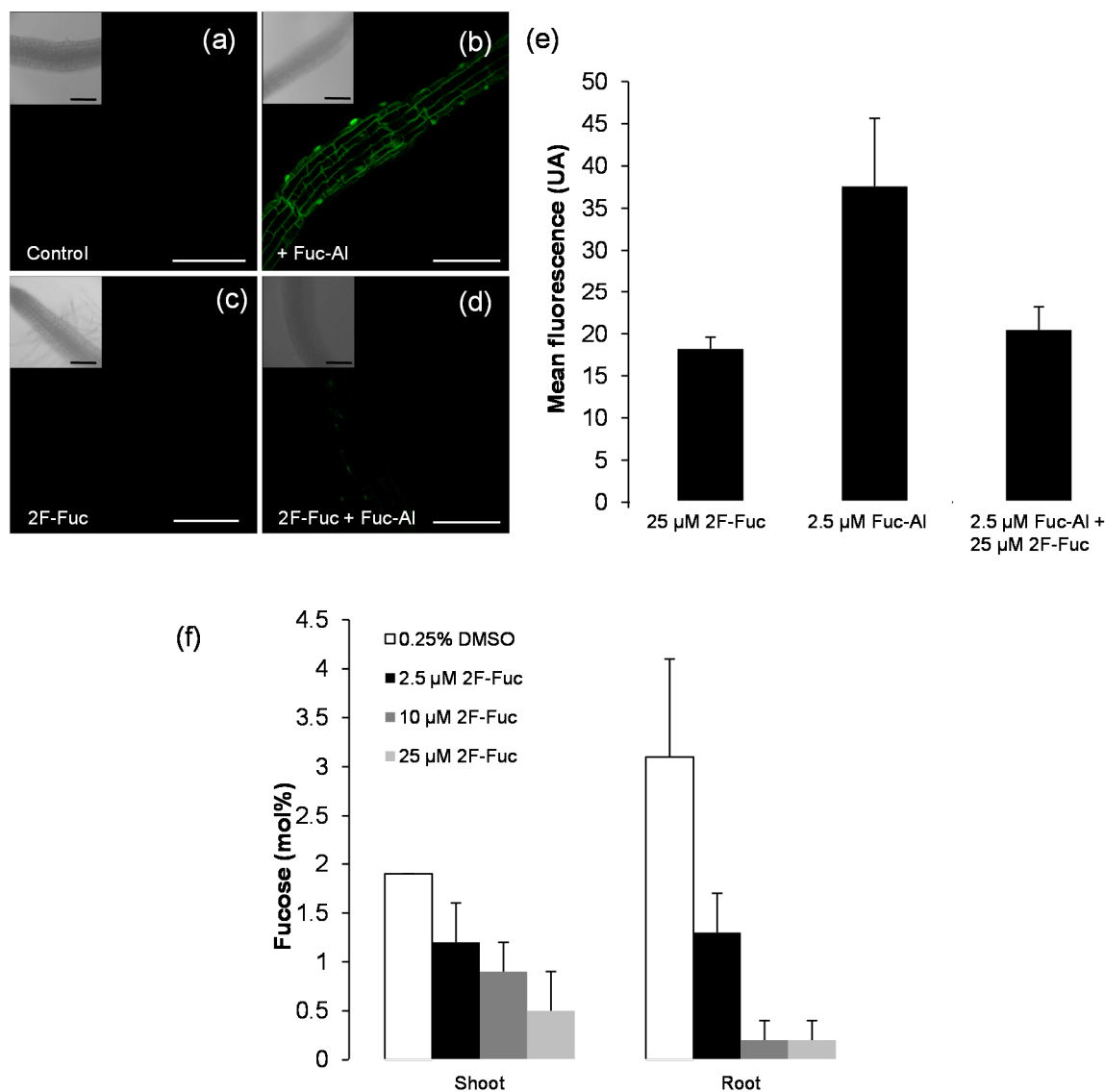


Figure 2 : Effect of 2F-Fuc on fucose incorporation into the root cell walls.

(a)-(e) Click-mediated labelling of *Arabidopsis* seedling cell walls using the alkynylated fucose analogue Fuc-AI. Four-day-old seedlings grown on MS were incubated in liquid MS medium \pm Fuc-AI (a-b) for 16 h and 4 day-old seedlings grown on MS supplemented with 25 μ M 2F-Fuc were incubated in liquid MS medium \pm Fuc-AI + 25 μ M 2F-Fuc (c-d) for 16 h and labelled. Scale bars = 100 μ m.

(e) Quantification of the root-tip fluorescence, Data are the mean \pm SEM (n > 6). Data are from three experiments.

(f) Fucose contents (mol%) determined by gas chromatography analysis of cell walls isolated from 10-day-old *Arabidopsis* seedlings grown with 2.5 to 25 μ M 2F-Fuc or DMSO (control). n > 300 seedlings per replicate. Data are the mean \pm SEM of 3 biological replicates.

fucosylation of cell wall polysaccharides or glycoconjugates, we first carried out click-mediated labelling experiments. Anderson *et al.* (2012) have recently shown that an alkynylated L-fucose analogue (Fuc-Al) is a useful probe for imaging fucose-containing cell wall polysaccharides in *Arabidopsis*. Fig. 2a-b shows that 4-day-old seedlings were efficiently labelled after incorporation of Fuc-Al into the newly synthesized wall and coupling to Alexa Fluor 488 azide probe through a copper-catalyzed azide–alkyne cycloaddition. In contrast, the labelling was strongly reduced in seedlings treated with 25 μM 2F-Fuc, indicating that this fluoro analogue inhibits the transfer of Fuc-Al to cell wall polysaccharides (Fig. 2c-e).

Fucose contents in shoot and root cell walls of 10-day-old *Arabidopsis* seedlings treated with 2.5 μM to 25 μM 2F-Fuc were measured by gas chromatography (Fig. 2f). In comparison with control seedlings (DMSO), fucose content in root cell walls was reduced by about 50% in seedlings treated with 2.5 μM 2F-Fuc, whereas only traces of fucose were detected in seedlings treated with 10 μM and 25 μM 2F-Fuc. Beyond its effect on fucose content, 2F-Fuc treatment did not strongly affect the sugar composition of root seedling cell walls (Table S1). For instance, galacturonic acid (GalA) content in roots was about 25% of total cell wall sugars regardless of 2F-Fuc concentration. In contrast to roots, the effect of 2F-Fuc on shoots was less severe. Twenty-five percent of the fucose content in shoot cell walls was still detected in 25 μM 2F-Fuc-treated seedlings in comparison with the negative control (0.25% DMSO). Taken together, these data suggested that 2F-Fuc acts as a potent plant fucosyltransferase inhibitor that is able to suppress fucosylation in the cell wall polysaccharides of root tissues at 10 μM concentration.

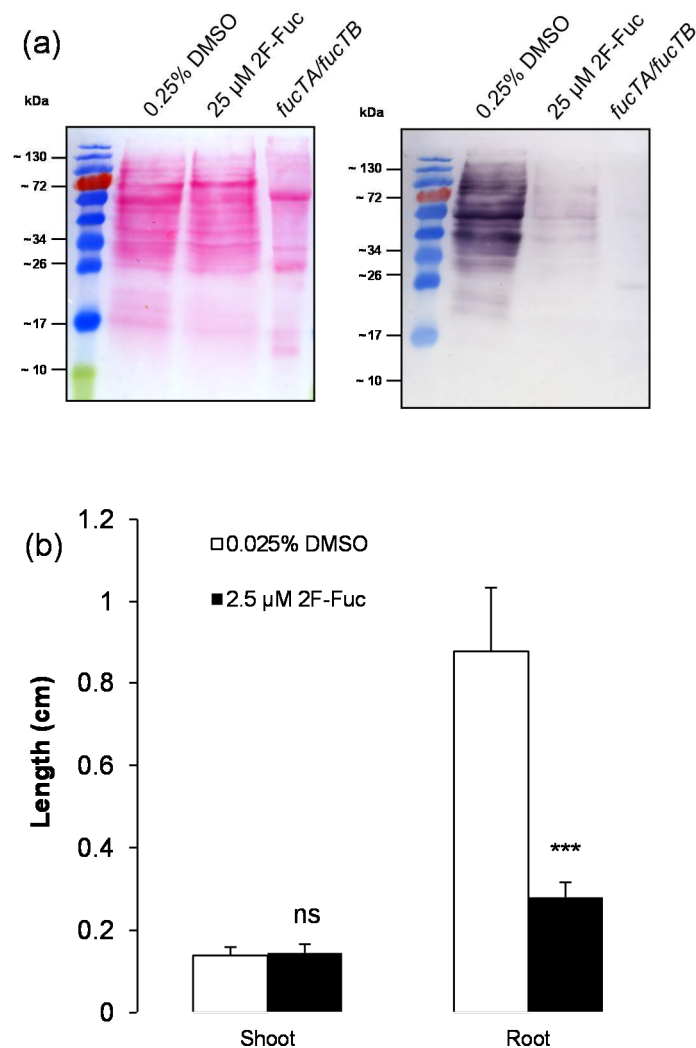


Figure 3 : Effect of 2F-Fuc on the fucosylation of N-glycoproteins.

(a) Ponceau S staining (left) and Western blot (right) using antibody directed against the core α -(1,3)-fucose *N*-glycans. *fucTA/fucTB*: double *fucTA/fucTB* mutant impaired in *N*-linked glycan fucosylation.

(b) Shoot and root lengths of 4-day-old *cgl* seedlings grown in the presence of 0.025% DMSO (control) or 2.5 μM 2F-Fuc ($n > 20$ seedlings). Mann-Whitney test.

2F-Fuc treatment affects xyloglucan and glycoprotein fucosylation in *Arabidopsis* seedlings, but these changes are not responsible for the 2F-Fuc-induced root growth defect.

The *Arabidopsis* cell wall contains several fucose-containing polysaccharides and glycoconjugates such as xyloglucan (Perrin *et al.*, 2003), *N*-glycosylated proteins (Rayon *et al.*, 1998), pectic rhamnogalacturonan-I (RG-I) (Puhlmann *et al.*, 1994) and rhamnogalacturonan-II (RG-II) (Glushka *et al.*, 2003), and arabinogalactan proteins (AGPs) (Tryfona *et al.*, 2012). To investigate whether the fucosylation of *N*-glycosylated proteins is affected by the 2F-Fuc treatment, we extracted proteins from *Arabidopsis* root seedlings treated with 25 μ M 2F-Fuc. Analysis of their fucosylation was investigated by immunodetection with an antibody directed against the core $\alpha(1,3)$ -fucose epitope (Faye *et al.*, 1993). As shown in Fig. 3a, glycoproteins were detected at much lower amounts in 2F-Fuc treated-root seedlings in comparison with non treated seedlings (0.25 % DMSO). The specificity of the primary antibody was confirmed by a lack of detection in *fucTA/fucTB Arabidopsis* double mutant seedlings impaired in *N*-glycan $\alpha(1,3)$ -fucosyltransferases (Strasser *et al.*, 2004). Moreover, the effect of 2F-Fuc on the growth of the *cgl* (*complex glycan-deficient*) mutant was investigated. This *Arabidopsis* mutant is impaired in Golgi *N*-acetyl glucosaminyltransferase I, preventing the synthesis of fucosylated complex-type *N*-linked glycans, but does not exhibit obvious growth phenotypes when grown in standard conditions (von Schaewen *et al.*, 1993). The root growth of *cgl* seedlings was affected by 2.5 μ M 2F-Fuc treatment as observed for Col-0 seedlings, indicating that the decrease of *N*-glycoprotein fucosylation induced by 2F-Fuc treatment is not responsible for the observed root growth inhibition (Fig. 3b).

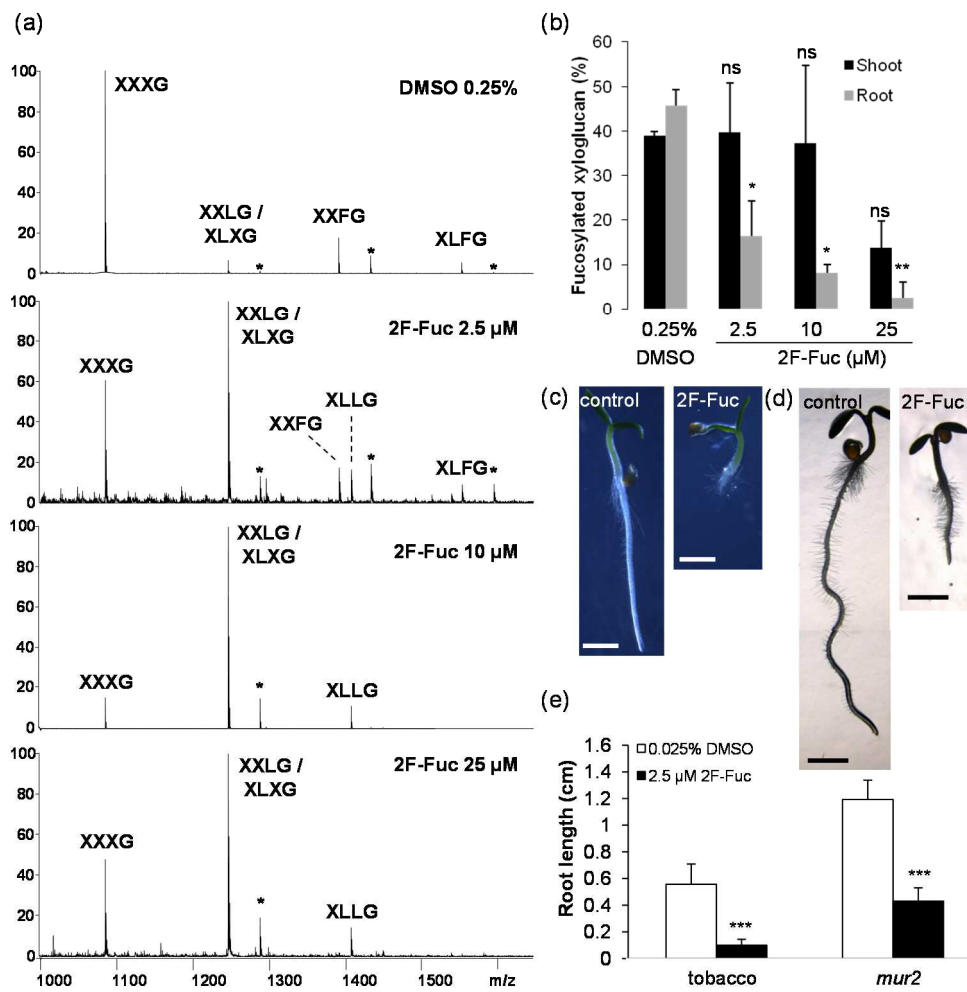


Figure 4: Effect of 2F-Fuc on xyloglucan fucosylation.

(a) MALDI-TOF mass spectra of endoglucanase-generated xyloglucan fragments from 10-day-old *Arabidopsis* root seedlings grown on medium supplemented with 2.5 to 25 μM 2F-Fuc or DMSO (control). XXXG to XLFG: xyloglucan fragments according to the nomenclature reported by Fry *et al.* (1993). Asterisks indicate acetylated xyloglucan fragments.

(b) Relative ratio of fucosylated xyloglucan fragments in roots and shoots detected in the enzyme fingerprints. n > 200 seedlings per replicate. Data are the mean ± SEM of at least two replicates. Non-parametric t-test.

(c) Seven-day-old *N. benthamiana* seedlings grown on MS medium supplemented with DMSO (control) or with 2.5 μM 2F-Fuc. Scale bars 0.2 cm.

(d) Four-day-old *Arabidopsis mur2* seedlings grown on medium supplemented with DMSO (control) or with 2.5 μM 2F-Fuc. Scale bars 0.2 cm.

(e) Root length measurements of 7-day-old tobacco (*N. benthamiana*) and 4-day-old *mur2* seedlings grown in the presence of 0.025% DMSO (control) or 2.5 μM 2F-Fuc. Data are the mean ± SEM (n>24). Unpaired t-test.

Arabidopsis xyloglucan (XyG) consists of a β -1,4-glucan backbone substituted with α (1,6)-xylosyl residues (side chain X, Fry *et al.*, 1993). Terminal Gal (side chain L, Fry *et al.*, 1993) or Fuc α (1,2)Gal disaccharides (side chain F, Fry *et al.*, 1993) can also be β (1,2)linked to xylosyl residues. XyG fingerprints from cell walls of shoots and roots of *Arabidopsis* seedlings treated with DMSO (control) or 2.5 to 25 μ M 2F-Fuc were investigated according to Lerouxel *et al.* (2002). Cell walls were isolated and subjected to an endoglucanase digestion, and the resulting fragments were then analyzed by MALDI-TOF MS (Fig. 4a). Comparison of fingerprints obtained from seedlings treated with 2.5 μ M to 25 μ M 2F-Fuc with the fingerprint of the negative control (DMSO) showed a dose-dependent decrease of fucosylated fragments (XXFG and XLFG) together with an increase of non-fucosylated fragments. Quantification of xyloglucan fragments detected in MALDI-TOF MS indicated a 60% fucosylation decrease for roots treated with 2.5 μ M 2F-Fuc and detection of very low traces of fucosylated fragments for higher concentrations (Fig. 4b). In agreement with the lower amount of total fucose in shoot cell walls (Fig. 2e), fucosylation of XyG in *Arabidopsis* shoots was slightly affected by treatments with 2.5 μ M and 10 μ M 2F-Fuc. Only treatment with 25 μ M 2F-Fuc was sufficient to induce a detectable decrease of XyG fucosylation in cell walls derived from shoot tissues (Fig. 4b).

AtFUT1 is a Golgi-localized fucosyltransferase that can add α (1,2)-Fuc residues onto XyG (Perrin *et al.*, 1999). The effect of 2F-Fuc on *Arabidopsis* AtFUT1 was investigated *in vitro*. The transferase capacity of recombinant AtFUT1 produced in insect cells was monitored in the presence of 1 mM 2F-Fuc (O. Lerouxel, personal communication). A weak inhibitory activity was observed, suggesting that 2F-Fuc must be activated into GDP nucleotide sugar to inhibit the AtFUT1 transferase (Fig. S2) (Burkart *et al.*, 2000; Okeley *et al.*, 2013).

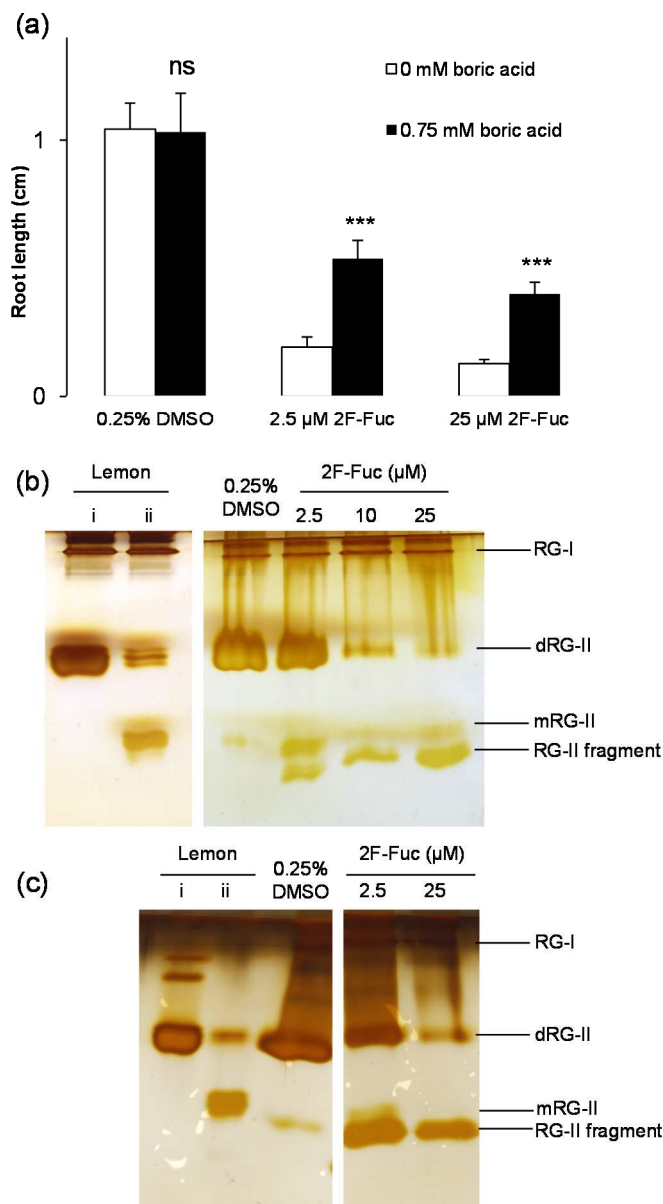


Figure 5: Effects of 2F Fuc on RG-II dimerisation.

(a) Root length of 4-day-old *Arabidopsis* seedlings treated with 2.5 μM or 25 μM 2F-Fuc, 0.75 mM boric acid or both. DMSO: negative control. Data are mean ± SEM (n>18 seedlings). Mann-Whitney test, data are compared to control (0 mM boric acid with equal concentration of 2F-Fuc).

(b)-(c) Polyacrylamide gel electrophoresis. RG-II was extracted from 10-day-old *Arabidopsis* roots grown on medium supplemented with 2.5, 10 or 25 μM 2F-Fuc (b), 0.75 mM boric acid, or both (c). RG-II extracted from lemon was used as control (i), additional 16 h incubation with 0.1 M HCl treatment leads to a partial monomerization of RG-II (ii). RG-I : Rhamnogalacturonan I ; mRG-II: monomeric RG-II ; dRG-II : dimeric RG-II.

Arabidopsis mur2 (*murus2*) and tobacco seedlings were grown in presence of 2.5 μ M 2F-Fuc. *Arabidopsis mur2* is mutated in AtFUT1 and its cell walls contain less than 2% of the wild type content of fucosylated xyloglucan without affecting root growth (Vanzin *et al.*, 2002). *Nicotiana benthamiana*, like all solanaceae, accumulates a non fucosylated xyloglucan in its cell walls (York *et al.*, 1996; Hoffman *et al.*, 2005) with the exception of pollen (Lampugnani *et al.*, 2013; Dardelle *et al.*, 2015). In both *mur2* and tobacco seedlings, root elongation was strongly affected by 2F-Fuc treatments (Fig. 4c-e). Again, this suggests that the inhibition of root growth by 2F-Fuc was not related to a deficiency in xyloglucan fucosylation.

2F-Fuc-treated *Arabidopsis* seedlings are impaired in rhamnogalacturonan II biosynthesis.

In RG-II, two Fuc residues are present in the side chains, a terminal 2-*O*-methyl Fuc in side chain A and an internal α (1,4)-Fuc in side chain B (Fig. S1). Boron is responsible for the RG-II dimerisation that is required for efficient primary cell wall elongation (O'Neill *et al.*, 2001). Thus, the effect of boron on 2F-Fuc-treated seedlings was investigated. Supplementation of the culture medium containing 2.5 μ M 2F-Fuc with 0.75 mM boric acid was able to partially restore root growth. These data suggest that the growth phenotype observed in the presence to 2F-Fuc is likely caused at least partially by RG-II defects (Fig. 5a). At higher concentrations (25 μ M) of inhibitor, boric acid also partially rescued root elongation (Fig. 5a).

To assess RG-II dimerization in 2F-Fuc-treated seedlings, we carried out the polyacrylamide gel electrophoresis method described by (Chormova *et al.*, 2014) for the separation of monomeric (mRG-II) from dimeric RG-II (dRG-II). Cell walls were prepared

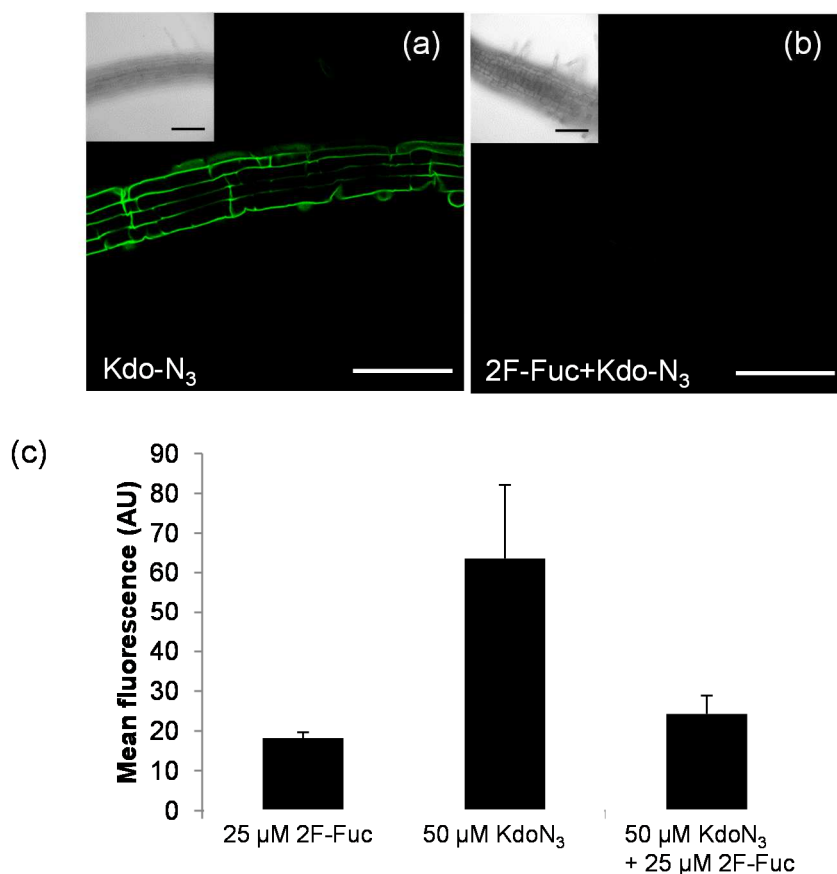


Figure 6: Effect of 2F-Fuc on Kdo-N₃ incorporation.

(a)-(b) Click-mediated labelling of *Arabidopsis* seedling using the azido Kdo analogue Kdo-N₃. Four-day-old seedlings were grown on MS medium supplemented with or without 25 μM 2F-Fuc. Seedlings were then incubated in liquid MS medium containing 50 μM Kdo-N₃ alone (a) and 25 μM 2F-Fuc (b). Scale bars : 100 μm.

(c) Quantification of the root-tip fluorescence. Data are the mean ± SEM (n > 10 seedlings from three experiments).

from roots of 10-day-old seedlings grown with 0.25% DMSO or 2F-Fuc at 2.5, 10 and 25 μM concentrations. RG-II was then solubilized by endo-polygalacturonase treatment of cell walls and submitted to gel electrophoresis (Fig. 5b). The relative amount of cell wall sugars for each RG-II enriched fraction was assessed by gas chromatography and identical cell wall quantities were loaded on the gel. Lemon mRG-II and dRG-II were used as standards. RG-II extracted from untreated *Arabidopsis* root seedlings was mainly in a dimeric form as reported in the literature (O'Neill *et al.*, 2004). Treatment of seedlings with 2.5 μM 2F-Fuc clearly induced a decrease of dRG-II together with an increase of mRG-II and a RG-II fragment. At 10-25 μM , 2F-Fuc greatly diminished *in muro* accumulation of RG-II (Fig. 5b). Although low amounts of the small RG-II fragment were still detected on SDS-PAGE, this suggests that inhibition of fucosylation results in defects in mRG-II and dRG-II biosynthesis. In the presence of 0.75 mM boric acid, SDS-PAGE of RG-II fractions isolated from 2.5 μM 2F-Fuc-treated seedlings showed an increase in the relative amount of dRG-II accumulation, suggesting that boron was able to promote RG-II dimerization (Fig. 5c). However, the small RG-II fragment was still detected under these conditions, indicating that its dimerization was not restored in presence of boric acid.

Incubation of *Arabidopsis* light-grown seedlings with 8-azido 8-deoxy Kdo (Kdo-N₃) followed by click-mediated coupling to an alkyne-containing fluorescent probe through a copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition provides an efficient method for RG-II imaging in cell walls without the need for RG-II-specific antibodies (Dumont *et al.*, submitted). Fig. 6a shows that incubation of seedlings with 50 μM Kdo-N₃ induced a robust labeling of their cell walls. In contrast, this incorporation was suppressed by 25 μM 2F-Fuc treatment (Fig. 6b-c) confirming that high concentrations of 2F-Fuc inhibit RG-II biosynthesis.

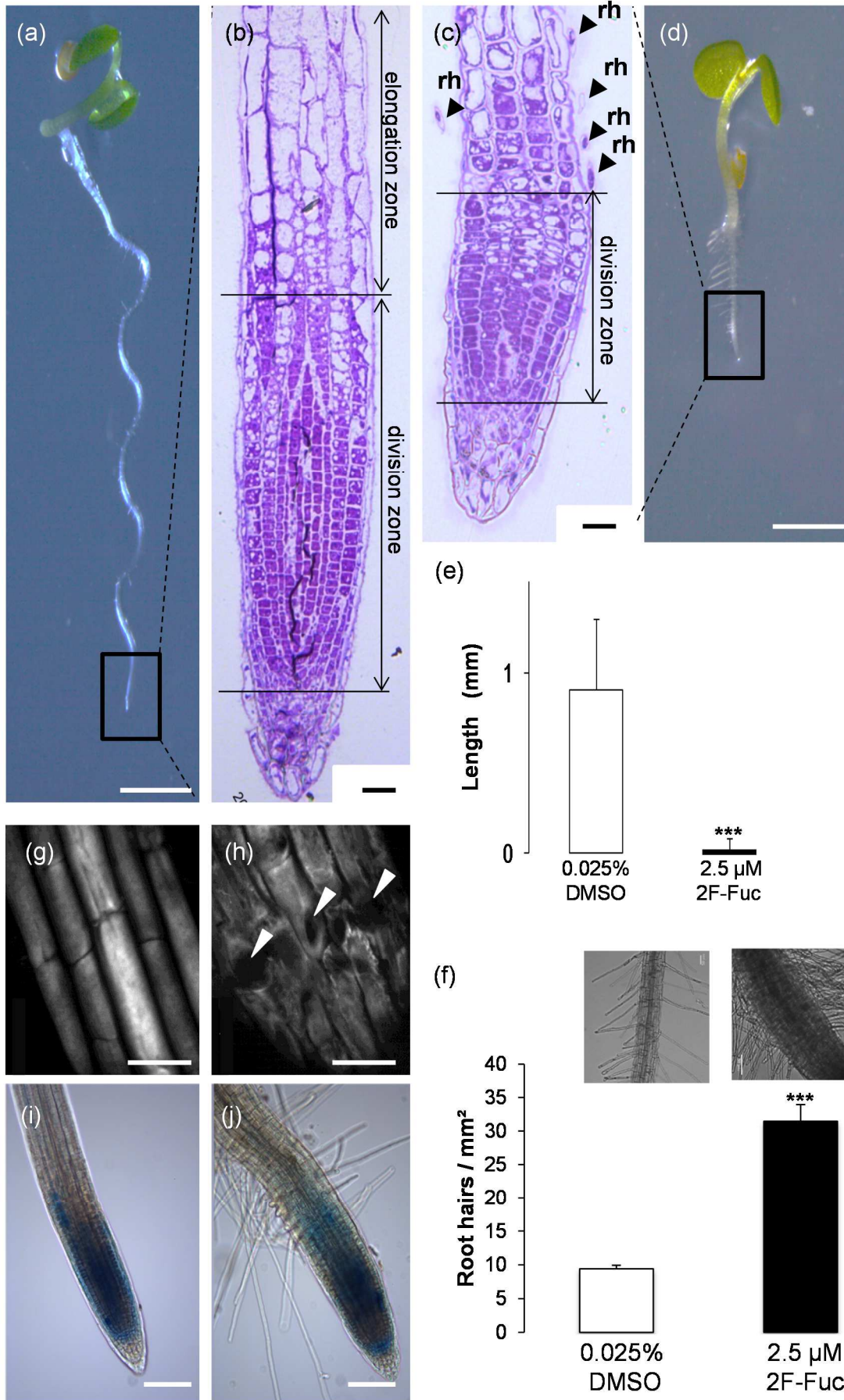


Figure 7 : Effect on *Arabidopsis* root architecture.

(a)-(d) Four-day-old *Arabidopsis* seedlings grown with 0.025% DMSO (a-b) or 2.5 μ M 2F-Fuc (c)-(d). The frames at the apex of the root (a, d) indicate the zone shown in (b)-(c). (b)-(c) Longitudinal sections showing the root cell organisation in the division and the elongation zones. Arrows indicate the presence of root hairs (rh).

(e) Distance measured between the apex and the early differentiation zone of 4-day-old *Arabidopsis* seedlings grown with 0.025% DMSO or 2.5 μ M 2F-Fuc. Data are mean \pm SEM (n>15 roots).*** $p<0.001$. Mann-Whitney test.

(f) Root hairs density of *Arabidopsis* seedlings grown with 0.025% DMSO or 2.5 μ M 2F-Fuc (n>25 roots). Data are mean \pm SEM.*** $p<0.001$. Mann-Whitney test.

(g-h) Calcofluor staining of *Arabidopsis* roots grown with 0.025% DMSO (g) or 2.5 μ M 2F-Fuc (h). Arrowheads point out cell wall defects in the elongation zone.

(i)-(j) Analysis of root meristem activity of *Arabidopsis* 4-day-old *pCYCB1::GUS* seedlings grown with 0.025% DMSO (i) or 2.5 μ M 2F-Fuc (j). *pCYCB1::GUS* line were used to visualize the division zone in non-treated and treated plants.

Scale bars : 1 mm (a)-(d) ; 20 μ m (b)-(c) ; 25 μ m (g)-(h) ; 100 μ m (i)-(j).

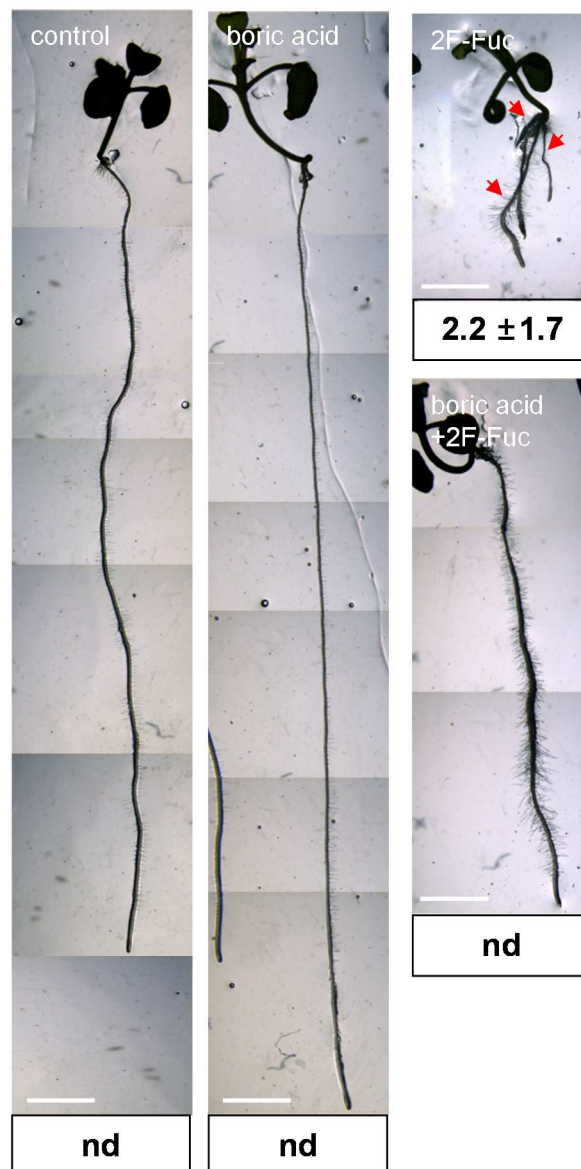


Figure 8 : Emergence of adventitious roots in 14-day-old *Arabidopsis* treated seedlings.

Fourteen-day-old *Arabidopsis* seedlings grown on control medium (0.025% DMSO) or 0.75 mM boric acid with or without 2.5 μ M of 2F-Fuc. Images were assembled using Microsoft Office Powerpoint. The average number of adventitious roots is indicated for the 2.5 μ M 2F-Fuc, nd. No adventitious root was detected in the other conditions. Data are mean \pm SEM. (n>24 roots). Red arrows indicate adventitious roots. Scale bars 3 mm.

Analysis of root architecture in 2F-Fuc-treated *Arabidopsis* seedlings

The *Arabidopsis* root is organized into an apical meristem where cells divide, an elongation zone where cells expand, and a differentiation zone where cells acquire their determined size, shape and functions. As reported in Fig. 1a, 2F-Fuc-treated *Arabidopsis* seedlings exhibit a strong root growth defect. Observation of root tips of 2.5 μ M 2F-Fuc-treated seedlings revealed that the entire elongation zone is strongly diminished with differentiated cells close to the root tip in comparison with control seedlings (Fig. 7a-e and Fig. S5). This resulted in a hairy root phenotype of 2F-Fuc-treated seedlings that is characterized by the appearance of densely packed root hairs (Fig. 7f). Staining of cell walls with the glucan-binding fluorescent dye calcofluor white revealed defects in cellulose organization and cell wall integrity in 2F-Fuc-treated root epidermal cells in the elongation zone. In contrast to control cells, where calcofluor staining was relatively evenly distributed along the cell wall, the cell wall network of 2F-Fuc-treated *Arabidopsis* roots appeared disorganized as previously described for some cell wall mutants (Anderson *et al.*, 2010). Moreover the presence of gaps in the cell wall suggests the existence of point of weakness in the wall (Fig. 7g-h).

Closer investigation of the root tip of 2.5 μ M 2F-Fuc-treated seedlings did not reveal disorganization in the meristematic zone of *Arabidopsis* roots by comparison with control roots, with similar cell numbers, types, and shapes. Actively dividing cells were visualized in *Arabidopsis* seedlings expressing the GUS reporter gene under the control of the Cyclin-dependent protein kinase 1 (CYCB1) promoter. Staining of seedlings expressing the *pCYCB1::GUS* fusion protein in 2F-Fuc-treated roots did not reveal any reduction in cell division activity in the apical meristem in comparison with control seedlings (Fig. 7i-j), suggesting that the fucosylation inhibitor does not dramatically affect cell division. For confirmation of this idea, the cell division rate of suspension-cultured BY-2 tobacco cells was

monitored in the presence of 2F-Fuc. No significant effect was observed on BY-2 cell growth even at 100 μ M 2F-Fuc (Fig. S3).

After 2 weeks of growth in the presence of 2.5 μ M 2F-Fuc, in addition to the densely packed root hair phenotype, *Arabidopsis* seedlings exhibited multiple adventitious roots that are not observed in control plants or in plants supplemented with 0.75 mM boric acid (Fig. 8a-b). This suggested that 2F-Fuc induces important changes in *Arabidopsis* root architecture at micromolar concentrations.

DISCUSSION

2F-Fuc is a strong inhibitor of plant fucosyltransferase activity and inhibits cell elongation

Screening of commercially available fluoro monosaccharides as putative growth inhibitors revealed that 2F-Fuc is able to reduce root growth at micromolar concentrations. In contrast, 3F-NeuAc has no effects on root growth whereas 2F-Glc, the most active fluorinated glucose molecule we tested, induced growth phenotypes at 25 μ M. Growth effects were less severe on shoots for all of the analogues tested, possibly due to poor uptake of the fluoro monosaccharides into shoot tissues or due to differences in these cell walls as compared to root tissues. The former possibility is supported by the fact that we observed effects on root growth only for peracetylated forms of the fluoro monosaccharides. The impacts of fluoro glucose analogues on either glucosyltransferase inhibition or on glucose cytosolic metabolism were not investigated further. Several lines of evidence demonstrate that 2F-Fuc is an efficient inhibitor of plant fucosyltransferases. First, a 50% decrease was observed in the fucose content of root cell walls after treatment with 2.5 μ M 2F-Fuc, and only traces of fucose were detected after treatment with higher concentrations of 2F-Fuc. Analysis of xyloglucan and *N*-glycoprotein fucosylation led to the same conclusions. This indicates that at concentrations as low as 10 μ M, the fucosylation of polysaccharides and glycoconjugates is fully inhibited by 2F-Fuc in

Arabidopsis seedling roots. As observed for the growth phenotypes, less severe underfucosylation was found in shoots. In addition to the possibilities listed above, this might also reflect minimal transport of the sugar analogue from roots to the aerial parts of the plant, possibly due to the diffusion barrier presented by the endodermis.

Enzymatic assay performed on AtFUT1 suggested that the 2F-Fuc must be converted into GDP-2F-Fuc to mimic the transition-state and bind tightly to the active site of fucosyltransferases leading to a competitive inhibition (Burkart *et al.*, 2000; Rillahan *et al.*, 2012; Okeley *et al.*, 2013).

Root growth is strongly affected by 2F-Fuc at micromolar concentrations. Since several plant polymers contain fucose residues, the relationship between underfucosylation and the root growth phenotype we observed was initially unclear. *Arabidopsis* xyloglucan and *N*-linked glycoproteins contain terminal fucose residues. However, these sugar motifs are not crucial for plant growth and mutants impaired in xyloglucan and *N*-glycoprotein fucosylation do not exhibit any phenotypes when grown in standard conditions (von Schaewen *et al.*, 1993; Vanzin *et al.*, 2002). Although the fucosylation status of AGPs was not investigated in this study, *fut4*, *fut6* and *fut4/fut6* deficient mutants affected in AGP fucosylation are also healthy (Liang *et al.*, 2013). Moreover, in presence of 2F-Fuc, xyloglucan and *N*-glycan mutants (*mur2* and *cgl*) exhibited growth phenotypes similar to those observed in wild-type treated plants, further suggesting that defects in glycoprotein and xyloglucan fucosylation are not responsible for the observed root developmental phenotypes.

The inhibition of fucosylation of cell wall polysaccharides would also be expected to affect RG-II, which contains fucose residues on side chains A and B. At low concentrations, 2F-Fuc induced a decrease in RG-II dimerization in root seedlings. At higher concentrations of 2F-Fuc, dimers of RG-II were greatly diminished, but this was not counterbalanced by a relative increase in the level of monomeric RG-II (Fig. 5b). A small RG-II fragment of unknown

structure was detected in our SDS-PAGE experiments (Fig. 5b), suggesting that RG-II structure is strongly affected by 2F-Fuc. Disruption in RG-II biosynthesis was confirmed by the inability of plants treated with 25 μM 2F-Fuc to incorporate Kdo-N₃ in a click-mediated labeling experiment (Fig. 6). It is possible that the synthesis and dimerization of RG-II within the Golgi apparatus involve enzyme complexes that are inefficient in producing RG-II when both side chains A and B are affected. It is worth noting that GalA contents in root cell walls were not affected by 2F-Fuc treatments, indicating that defects in RG-II biosynthesis do not affect the overall synthesis of pectins.

To date, any mutation that affects RG-II structure has been demonstrated to impact RG-II dimerisation and plant development. This was mainly deduced from the study of mutants defective in the biosynthesis of monosaccharides contained in RG-II (O'Neill *et al.*, 2001; Ahn *et al.*, 2006; Delmas *et al.*, 2008; Voxeur *et al.*, 2012). For instance, depletion of UDP-D-apiose/UDP-D-xylose synthase, the enzyme responsible for the synthesis of the RG-II-specific apiose residue, results in cell wall abnormalities including wall thickening and gaps. These phenotypes are likely due to the synthesis of altered RG-II in this mutant (Ahn *et al.*, 2006). We observed similar altered cell wall patterns using calcofluor staining in 2.5 μM 2F-Fuc-treated seedlings (Fig 7g-h). Among other *Arabidopsis* mutants defective in RG-II biosynthesis, *mur1* is impaired in fucose biosynthesis and is thus unable to properly fucosylate its cell wall polysaccharides and glycoproteins. The fucosylation defects of cell wall polysaccharides and proteins observed by inhibition of fucosyltransferases using 2F-Fuc (this study) are similar to those observed in fucose-deficient *mur1* mutants (O'Neill *et al.*, 2001; Rayon *et al.*, 1999). *mur1* plants exhibit growth defects, cell wall weakness and decreased RG-II dimerization (Reiter *et al.*, 1993 ; O'Neill *et al.*, 2001), demonstrating a relationship between RG-II biosynthesis and plant development. As we found for seedlings treated with 2F-Fuc, the supplementation of *mur1* plants with boron partially restores wild-type growth patterns (O'Neill

et al., 2001). We thus conclude that the root elongation deficiency observed in 2F-Fuc-treated plants results at least in part from defects in RG-II biosynthesis as demonstrated for the *murl* mutant.

Changes in root architecture are mediated by deregulation of hormone mediated signaling

Root cell elongation is strongly affected upon 2F-Fuc treatments and results in a high density of root hairs and the presence of differentiated cells close to the root tip (Fig. 7f). This growth phenotype was previously reported in plants treated with 2 β -deoxy-Kdo, which inhibits the CMP-Kdo synthesis that is required for RG-II biosynthesis (Smyth *et al.*, 2013). Defects in cell elongation in RG-II mutants have been reported to inhibit pollen tube growth and fertilization (Delmas *et al.*, 2008; Deng *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2011; Dumont *et al.*, 2014). In our study, close inspection of the root tip and monitoring cell division activity suggest that cell division was not affected by 2F-Fuc (Fig. 7i-j). This was confirmed by investigation of the division rate of suspension-cultured BY-2 cells in the presence of the inhibitor (Fig. S3). These data, together with previous studies showing that suspension-cultured plant cells are capable of continuous and long-term growth on boron-deficient medium, demonstrate that RG-II dimerization is not required for cell division (Fleischer *et al.*, 1999; Chormova *et al.*, 2014).

In addition to the inhibition of cell elongation, 2F-Fuc induces the formation of multiple adventitious roots (Fig. 8). These changes in root architecture caused by 2F-Fuc treatment are potentially due to a deregulation of hormone-mediated signaling since root growth is closely related to synthesis, distribution and transport of auxin and ethylene (Blilou *et al.*, 2005 ; Gutierrez *et al.*, 2012; Abreu *et al.*, 2014). Indeed, it was previously reported that deprivation of minerals (P, Fe, N, B ...) induces large changes in root growth as an adaptive response in order to maintain functional root architecture under mineral deficiency (López-Bucio *et al.*, 2003). This was illustrated through the study of plants grown in low concentrations of boron.

Boron is an essential micronutrient for vascular plant growth (Warrington, 1923). Indeed, the symptoms of boron deficiency are observed within one hour to few days, depending on the degree of deficiency and the plant species (Dell and Huang, 1997 ; Hajiboland *et al.*, 2012; Oiwa *et al.*, 2013). Inhibition of primary root elongation is the first response to a low boron supply (Hirsch and Torrey, 1980). Several studies have suggested that boron deficiency triggers an increase in indole acetic acid (IAA) synthesis in apical meristems accompanied with a decrease of the IAA oxidase activity. Auxin is then transported towards the elongation zone where it accumulates and inhibits root cell elongation (Rajaratnam and Lowry, 1974; Dugger, 1983; Martín-Rejano *et al.*, 2011).

Boron is not only required for RG-II dimerization in plant cell wall

RG-II is known to be the main boron binding site in plants, enabling this pectic polymer to dimerize. Recently, it was reported that boron is also involved in the wall-membrane attachment by cross-linking RG-II with the *cis*-diols groups of glycosylinositol phosphoceramides of lipid rafts (Wimmer *et al.* 2009, Voxeur and Fry, 2014). Supplementation of RG-II mutants with boron was demonstrated to partially restore wild-type growth phenotypes and the wild-type accumulation of RG-II dimers, demonstrating that RG-II dimerization is required for proper cell elongation (O'Neill *et al.*, 2001; Voxeur *et al.*, 2012; Smyth *et al.*, 2013). The capability of borate to partially rescue root growth in 2.5 μM 2F-Fuc-treated seedlings (Fig. 5a) is comparable to observations reported in RG-II deficient mutants. SDS-PAGE analysis of RG-II of 2.5 μM 2F-Fuc-treated plants supplemented with boric acid indicated an increase in the relative amount of dRG-II, suggesting that boric acid was able to restore the RG-II dimerization in inhibitor-treated roots. These data are in agreement with previous studies demonstrating a link between proper RG-II cross-linking and efficient cell elongation.

Boron was shown to also partially restore cell elongation in roots treated with high concentrations of 2F-Fuc. At such concentrations, RG-II biosynthesis is strongly affected without modification of overall root pectin content (Fig. 5b and 6, Table S1). In the SDS-PAGE experiment, the relative amounts of loaded cell wall fractions were identical. Thus, the disappearance of RG-II bands likely results from inhibition of RG-II biosynthesis rather than a decrease of pectic materials in the fractions isolated from the treated roots. This was confirmed by the metabolic click-labelling experiment using the azido Kdo analogue. As a consequence, partial rescue of cell elongation by boron cannot be solely attributed to the restoration of appropriate RG-II dimerization. Structural alteration of cell wall xyloglucans and pectins in *mur3* and *mur4* mutants causes a hypersensitive sugar responsive phenotype that is also rescued by boric acid (Li *et al.*, 2007). *mur3* and *mur4* mutants are affected in the synthesis of XyG and RG-I, respectively, and the growth restoration effects are not related to borate cross-linking of cell wall RG-II in these plant mutants. One can postulate that borate might also be involved in cross-linking of fucose residue in xyloglucans and RG-I as proposed by Li *et al.* (2007) and Blevins and Lukaszewski (1998). However, no biochemical evidence for fucose cross-linking in cell walls has been reported, so far. Together with data presented in this article, these data suggest that borate might be also perceived as a positive signal by the cellular machinery that coordinate hormone-related genes and genes related to cell wall modification and elongation. As recently speculated by Funakawa & Miwa (2015), the role of boron in primary cell wall may not be restricted to the physical cross-linking of the pectic network but boron might also be a sensor of cell elongation and/or cell wall integrity. In this respect, boron may be involved in signal transduction and in this context, beyond their structural functions in cell walls, RG-II dimers may also play a crucial role as *in muro* storage sites for boron like calcium and deesterified homogalacturonan (Braccini and Pérez, 2001; Wolf *et al.*, 2009; Leroux *et al.*, 2015).

Conclusion

In conclusion, this study further emphasizes the importance of RG-II and its borate-mediated dimerization in cell elongation and points out the potential of glycosyltransferase inhibitors as new tools for studying the function of cell wall polysaccharides in plant development. The use of these inhibitors enables the control of timing and dose-dependent inhibition of glycosyltransferases, two aspects that are not easily achievable by studying plant mutants.

Materials and methods

Plant material and growth conditions

Arabidopsis thaliana lines were derived from the Columbia ecotype (Col). Seeds were surface sterilized and sown onto *Arabidopsis* medium (Duchefa Biochemie n° DUO0742.0025) supplemented with 2 mM of $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, the pH was adjusted to 5.8 and 0.8% (w/v) Bacto Agar was added. Plates with seeds were placed for two days at 4°C in the dark, then submitted to 16-h-day/8-h-night cycles ($120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 21°C) in a vertical position. For click chemistry experiments, sterilized seeds were sown on Murashige and Skoog (MS 2.2 g.L⁻¹) mineral medium containing 1% sucrose and 0.8% plant agar (see below). *cgl* (*complex glycan-deficient*) seeds were obtained from C.T. Anderson (The Pennsylvania State University), *mur2* (*murus2*) seeds were ordered from NASC, and the *pCYCB1::GUS* line is from A. Marchant (Southampton University). Suspension cells of *Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow 2 (BY-2) were cultured in Murashige and Skoog liquid medium 4.3 g.L⁻¹ supplemented with 3% sucrose (w/v), 100 mg.L⁻¹ KH_2PO_4 , 51 mg.L⁻¹ myo-inositol, 1 mg.L⁻¹ thiamine, 0.22 mg.L⁻¹ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, pH 5.6, in dark, at 22°C, 140 rpm. BY-2 cells were sub-cultured every week by transferring 10 mL of suspension cells into 150 mL of fresh medium.

Chemical compounds

The fucosyltransferase inhibitor (2F-peracetyl-fucose) was purchased from Calbiochem® (Merck Millipore). 2-deoxy-2-fluoro-D-glucopyranose (2F-glucose), 3-deoxy-3-fluoro-D-glucopyranose (3F-glucose) and the 4-deoxy-4-fluoro-D-glucopyranose (4F-glucose) were obtained from LC Scientific Inc. Deoxy fluoro glucoses (5 mg) were peracetylated in 150 µL of 2:1 pyridine:acetic anhydride overnight at 20°C. Excess reagent was co-evaporated with toluene under a stream of air and the fluoro glucose analogues were finally dissolved in DMSO. To assess the effect of each sugar analogue on plant growth, the inhibitor was added directly into the growth medium at the desired concentration before seeds were sown. To assess effects on BY-2 cell division, sugar analogues were added to a 4-day-old cultures. For boron experiments, 0.75 mM boric acid was used because higher concentrations of borate had negative effect on root length.

Click chemistry

Click chemistry experiments were performed as described in Anderson *et al.* (2012). *Arabidopsis thaliana* Col-0 sterilized seeds were sown on Murashige and Skoog (MS 2.2 g.L⁻¹) mineral medium containing 1% sucrose and 0.8% plant agar. After two days at 4°C, the plates were placed vertically in the growth chamber for 4 d at 22°C under a 16 h light / 8 h dark cycle. Four-day-old light-grown seedlings were transferred from MS mineral medium plates to 1 mL of liquid MS containing 2.5 µM Fuc-Al (Invitrogen) for 16 h at 22°C in the growth chamber (16 h light / 8 h dark). Seedlings were then washed three times with liquid MS and then transferred to 1 mL of 0.1 µM Alexa Fluor® 488 azide (Invitrogen) solution in liquid MS containing 1 mM CuSO₄ and 1 mM ascorbic acid. The solution was incubated for 1 h at room temperature in the dark. Seedlings were then washed once with liquid MS, then 5 min with liquid MS supplemented with 0.01% (v/v) Tween 20 and three additional times in liquid MS. Control experiments were carried out by omitting either the Fuc-Al or the fluorescent probe in

click-mediated labeling assays. Inhibition of fucosyl transferases was carried out by adding 25 μM 2F-Fuc in the growth medium and then, by supplementing the liquid MS with 25 μM 2F-Fuc during the Fuc-AI incorporation step. Fuc-AI labeling was examined using a confocal laser-scanning microscope (Leica TCS SP2 AOBS; excitation filter, 488 nm; barrier filter, 495–550 nm). For the click chemistry experiment using Kdo- N_3 , the same protocol was used, 4-day-old seedlings were transferred for 16h in 1 mL liquid MS containing 50 μM Kdo- N_3 , washed and then labelled with 0.1 μM Alexa Fluor[®] 488 alkyne (Invitrogen) in liquid MS containing 1 mM CuSO_4 and 1 mM ascorbic acid. The fluorescence intensity of the root was calculated with ImageJ by thresholding (pixel intensity >16) to select the root boundary and measuring the mean of pixel intensity inside the area defined by the threshold.

Histochemical GUS staining

pCYCB1::GUS 6-day-old seedlings were incubated for 3 h in the dark, at 37°C, in the reaction solution containing 2 mM potassium ferrocyanide, 2 mM potassium ferricyanide, 50 mM NaPO_4 pH 7, 0.2% Triton X100 and 1mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronic acid (X-Gluc). *Arabidopsis* plants were observed under bright field using a stereomicroscope Leica M125 equipped with a DFC295 camera. At least 10 seedlings per treatment were observed and photographed.

Histochemical calcofluor staining

For cellulose staining with calcofluor white M2R (Sigma), fresh roots were incubated with the fluorescent probe (0.001% w/v) for 5 min in the dark. Then, the roots were mounted on glass microscope slides in a drop of water and observed by spinning disk confocal microscopy (Zeiss Observer.Z1) equipped with UV fluorescence (excitation filter, 359 nm; barrier filter, 461 nm).

Root length and fluorescence were measured from images using the ImageJ program (Abramoff *et al.*, 2004).

Plant cell wall extraction

The roots and shoots of 10-day-old seedlings grown on *Arabidopsis* medium (Duchefa Biochemie n° DUO0742.0025) supplemented or not with 2F-peracetyl Fucose were manually separated and then heated at 70°C for 15 min in 70% ethanol to inactivate enzymes. The tissues were then ground in a potter homogenizer and the homogenate was washed with 70% ethanol at 70°C, until the supernatant was clear and one more time with water. The remaining pellet, called the alcohol insoluble residue (AIR), was dried and was considered as representative of the cell walls.

Sugar composition analysis by gas chromatography–flame ionization detection (GC-FID).

For the determination and quantification of monosaccharide composition of noncellulosic polysaccharides, AIR from shoot and root of about 400 seedlings were successively hydrolysed using trifluoroacetic acid (2M, 2h at 110°C) and then submitted to a methanolysis for 16 h at 80 °C with 500 µL of dried 1M methanolic-HCl (Supelco). After evaporation of the methanol, the methyl glycosides were converted into their trimethylsilyl derivatives at 110°C for 20 min with 200 µL of the silylation reagent (HMDS:TMCS:Pyridine, 3:1:9, Supelco). After drying, derivatives were dissolved in 1 mL of cyclohexane and analyzed using a 3800 GC system equipped with a CP-Sil5-CB column (Agilent Technologies) and a flame ionization detector. The gradient temperature was from 120 to 160°C at 10°C.min⁻¹, 160 to 220°C at 1.5°C.min⁻¹ and 220 to 280°C at 20°C.min⁻¹. Quantification was carried out using inositol as internal standard and response factors previously determined for most common cell wall monosaccharides (Ara, Fuc, Gal, GalUA, Glc, GlcUA, Man, Rha, Xyl).

Extraction of Proteins

200 to 800 roots from 10-day-old *Arabidopsis* seedlings grown on *Arabidopsis* medium supplemented with respectively DMSO 0.25% and 2F-Fuc 25 μ M, were ground on ice in a 1 mL potter homogenizer in Tris 0.1 M pH 8 buffer containing 0.1% of SDS. The extract was then freeze-dried in a centrifugal vacuum concentrator. Proteins extracts were then resuspended in 300 μ L of Tris-SDS used for the extraction.

Immunoblotting

Protein extracts were separated by SDS-PAGE using a 12% polyacrylamide gel. The proteins were transferred onto nitrocellulose membrane and stained with Ponceau Red to control the transfer efficiency and to ensure that the same protein quantities were loaded for the two conditions. Before the immunoblotting, the free binding sites on nitrocellulose were blocked overnight with Tris-buffered saline (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5) (TBS) complemented with 0.1% Tween by gently agitation. The membrane was next incubated in the first antibody solution (anti-serum diluted to 1/10000 in PBS-Tween), a specific antibody directed against the core α (1,3)-fucose (anti-Fuc) epitope for 2 h (Faye *et al.*, 1993) and washed three times with TBS-Tween 0.1% for 10 min. The membrane was next incubated for 2 h in alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG (Sigma) diluted 1/1000 in PBS-Tween 0.1%. The membrane was finally washed six times in TBS-Tween 0.1% and three times in TBS for 5 min. The substrate of the alkaline phosphatase (Western Blue[®] Stabilized substrate for alkaline phosphatase, Promega) was applied on the membrane until the staining appeared. The reaction was stopped by rinsing in water.

Preparation of xyloglucan Fragments

Xyloglucan fragments were generated by treating the AIR isolated from 200 to 500 seedlings with 4 units of endoglucanase (endo-1,4- β -D-glucanase from *Trichoderma longibrachiatum*, catalog n° E-CELTR, Megazyme) in 100 μ L of 10 mM sodium acetate buffer, pH 5, for 18 h at 37°C. The enzyme cleaves the xyloglucan backbone after nonsubstituted Glc residues and release xyloglucan-derived oligosaccharides, from pentasaccharide XXG to decasaccharide XLFG fragments, according to the nomenclature established by Fry *et al.* (1993).

MALDI-TOF MS Analysis

The released xyloglucan fragments were then analyzed by MALDI-TOF-MS. Mass spectra were acquired on a Voyager DE-Pro MALDI-TOF (Ab Sciex) instrument equipped with a 337 nm nitrogen laser. Mass spectra were performed in the reflector delayed extraction mode using DHB as matrix (SIGMA-ALDRICH). This matrix, freshly dissolved at 5 mg.mL⁻¹ in a 70:30 acetonitrile / 0.1% TFA solution, was mixed onto the target with the water solubilized oligosaccharides in a ratio 1:1 (v/v). These spectra were recorded in a positive mode, using an acceleration voltage of 20,000 V with a delay time of 100 ns. They were externally calibrated using commercially available mixtures of peptides (ProteoMassTM Peptide MALDI-MS Calibration kit, SIGMA-ALDRICH). In particular, the spectra were externally calibrated using Bradykinin (757.3997 Da), angiotensin II (1,046.5423 Da), P₁₄R synthetic peptide (1,533.8582 Da) and ACTH₁₈₋₃₉ (2,465.1989 Da). Laser shots were accumulated for each spectrum, at least 3 times 1,000 laser shots. The main ions detected were assigned to [M+Na]⁺ adducts of XXXG, XXLG/XLXG, XLLG, XXFG, and XLFG on the basis of their Mr and literature data (Zablackis *et al.*, 1995; Pauly *et al.*, 2001; Lerouxel *et al.*, 2002). Fragments containing O-acetyl substituents on the Gal residues generated ions with 42 additional mass units (Kiefer *et al.*, 1989; Pauly *et al.*, 2001). Relative quantification of the different oligosaccharide species was performed based on the MALDI-TOF spectra. In this purpose, the intensity of the interesting

ions was extracted and used to calculate their relative abundance as compared to that of all the oligosaccharide structures identified. The values presented in the figure 4b correspond to the mean of data obtained from two independent oligosaccharide preparations and MALDI-TOF analyses. The standard deviation has been calculated and indicated.

Expression of truncated $\Delta 68$ -AtFuT1 in insect cells

Spodoptera frugiperda (Sf9, Invitrogen) cells used for the transfection were cultured in monolayer and maintained in Grace medium (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum (Sigma) and of $50\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ gentamycin (Sigma) at 27°C . The BTI-TN-5B1-4 cells (High FiveTM; Invitrogen) derived from *Trichoplusia ni* were cultured at 27°C either in monolayer for titering the virus stock in Express Five[®] SFM medium (Invitrogen) supplemented with 16 mM glutamine (Gibco) and $50\mu\text{g}/\text{ml}$ gentamycin or in suspension for recombinant $\Delta 68$ -AtFUT1 production in serum-free EXCELL405 medium (Sigma) supplemented with $50\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ gentamycin. The recombinant baculovirus (BaculogoldTM from Pharmingen) expressing $\Delta 68$ -AtFUT1 were grown and propagated in Sf9 monolayer cells. The transfer vector pVT-Bac-His1 (Dale *et al.*, 1997) derived from modified pVTBac (Tessier *et al.*, 1991) contains a melittin-cleavable signal peptide that targets the protein to the secretory pathway. pVT-Bac-His1- $\Delta 68$ -AtFut1 DNA (30ng) was co-transfected with 7 ng of BaculogoldTM AcNPV DNA into $4\cdot 10^4$ sf9 insect cells coated on 32 mm^2 tissue culture plate (Baculovirus Expression Vector System, Pharmingen) and incubated for 72 h at 27°C . Recombinant baculovirus released into the medium was amplified by several rounds of low multiplicity of infection (MOI of ~ 0.1) of Sf9 cells, and a higher titer virus stock ($\sim 10^8$ pfu. mL^{-1}) solution was harvested by centrifugation. The titer of the virus was determined by a 50% tissue culture infective dose (TCID₅₀) endpoint dilution assay in Hi5 cells cultured in Express Five as described previously (Reed LJ & Muench H, 1938). $\Delta 68$ -AtFuT1 was expressed as a soluble protein secreted in the medium supernatant. High-Five cells were cultured in erlen flasks in the serum-free EXCELL405 medium, at 27°C ,

in a shaking incubator at 120 rev.min⁻¹. They were maintained between 0.4 and 2 x 10⁶ per milliliter, and up to 4 x 10⁶ when reaching half of the final volume. The medium supernatant containing the secreted protein was either stored at -80°C or used in activity test.

Fucosyltransferase Activity test

Fucosyltransferase activity of Δ68-AtFuT1 onto tamarin xyloglucan was carried out in final volume of 100 μl containing 134 ng of protein, 10 mM MnCl₂, 10 mM MgCl₂, 30 μM of Cold GDP-Fuc, 1.5 μM (20 nci, 45'000cpm) of GDP-[¹⁴C]-Fuc in 10 mM of buffer Hepes-KOH (pH 7) with or without 2F-Fucose at 1mM. Xyloglucan was used as the varied substrate to determine effect of 2F-Fucose onto Δ68-AtFuT1 activity. Reactions were incubated at 30°C for 30 min, terminated by addition in the reaction mix of 1 mL of anion exchange resin AG 1x8 resin (in ddH₂O; 200-400 mesh) in a final ratio of 1 g resin per 4 mL deionized water. NDP-sugar will then bind to the resin and quench the reaction. Reaction mix is then span 2 min at 13'000 g and 600 μL of supernatant is collected. This last step is repeated once and supernatant is pooled with the previous and place into a counting flask of 5 mL to measure radioactivity incorporation into the xyloglucan polymer. Scintillation liquid (3.8mL) is added to the flask and flasks are counted for 1 min using a Packard Bell instrument.

Isolation of RG-II

Roots from 200 to 1000 seedlings were ground in a 1 mL potter homogenizer in 70% EtOH. The homogenate was centrifuged at 14 000 g for 10 min and the pellet was washed with 70% ethanol until the supernatant was clear. Additional washing was performed in 100% acetone. The resulting AIR was dried and was treated with 1 M Na₂CO₃ at 4°C for 16 h, then rinsed with water until neutral pH. The pellet was suspended in 500 μL ammonium acetate buffer (0.05M, pH 4.8) with 5 U endo-polygalacturonase from *Aspergillus niger* (5000 U.mL⁻¹, Megazyme) and incubated at 37°C for 16 h. Solubilized material was concentrated in a centrifugal vacuum

concentrator. The RG-II was suspended in 25 μ L ammonium acetate buffer. The relative amount of cell wall sugars for each RG-II enriched fraction was assessed by gas chromatography before running on a polyacrylamide gel electrophoresis.

Polyacrylamide Gel Electrophoresis of RG-II.

Polyacrylamide gel electrophoresis was performed according to Chormova *et al.* (2014) with few changes. A 10% polyacrylamide stacking gel was added to a 26% polyacrylamide gel. 8 μ L of RG-II samples were mixed with 2 μ L sample buffer (0.63 M Tris-HCl containing 0.25% (w/v) bromophenol blue and 50% (v/v) glycerol, pH 8.8). 80 μ g of RG-II extracted from lemon was used as control. For monomerisation, lemon RG-II was incubated for 16 h at room temperature in 0.1 M HCl (v/v). Before loading, sample was neutralized with 0.1 M NaOH (v/v). Electrophoresis was conducted at 220 V for 130 min. The gel was then fixed in ethanol/acetic acid/water (4:1:5) for 30 min and washed three times in 30% ethanol for 10 min and three times in water for 10 min each. Silver staining was performed as described by Chormova *et al.* (2014).

Statistical analysis

The data were analyzed statistically by using the GraphPad Software (La Jolla, CA, USA; www.graphpad.com). Differences were considered statistically significant when $p \leq 0.01$ (*), highly significant when $p < 0.001$ (**) and very highly significant when $p < 0.0001$ (***)

References

- Abramoff, M.D., Magalhães, P.J. and Ram, S.J.** (2004) Image processing with ImageJ. *Biophotonics Int.*, **11**, 36–42.
- Abreu, I., Poza, L., Bonilla, I. and Bolaños, L.** (2014) Boron deficiency results in early repression of a cytokinin receptor gene and abnormal cell differentiation in the apical root meristem of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol. Biochem. PPB Société Fr. Physiol. Végétale*, **77**, 117–121.

- Ahn, J.-W., Verma, R., Kim, M., Lee, J.-Y., Kim, Y.-K., Bang, J.-W., Reiter, W.-D. and Pai, H.-S.** (2006) Depletion of UDP-D-apiose/UDP-D-xylose synthases results in rhamnogalacturonan-II deficiency, cell wall thickening, and cell death in higher plants. *J. Biol. Chem.*, **281**, 13708–13716.
- Albersheim, P., Darvill, A., Roberts, K., Sederoff, R. and Staehelin, A.** (2010) Plant cell walls: from chemistry to biology. Garland Science, New York.
- Anderson, C.T., Carroll, A., Akhmetova, L. and Somerville, C.** (2010) Real-time imaging of cellulose reorientation during cell wall expansion in Arabidopsis roots. *Plant Physiol.*, **152**, 787–796.
- Anderson, C.T., Wallace, I.S. and Somerville, C.R.** (2012) Metabolic click-labeling with a fucose analog reveals pectin delivery, architecture, and dynamics in Arabidopsis cell walls. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **109**, 1329–1334.
- Bar-Peled, M., Urbanowicz, B.R. and O’Neill, M.A.** (2012) The synthesis and origin of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II – insights from nucleotide sugar formation and diversity. *Front. Plant Sci.*, **3**, 92.
- Blevins, D.G. and Lukaszewski, K.M.** (1998) Boron in plant structure and function. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**, 481-500.
- Blilou, I., Xu, J., Wildwater, M., Willemsen, V., Paponov, I., Friml, J., Heidstra, R., Aida, M., Palme, K. and Scheres, B.** (2005) The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots. *Nature*, **433**, 39–44.
- Bouton, S., Leboeuf, E., Mouille, G., Leydecker, M.-T., Talbotec, J., Granier, F., Lahaye, M., Höfte, H. and Truong, H.-N.** (2002) QUASIMODO1 encodes a putative membrane-bound glycosyltransferase required for normal pectin synthesis and cell adhesion in Arabidopsis. *Plant Cell*, **14**, 2577–2590.
- Braccini, I. and Pérez, S.** (2001) Molecular basis of Ca²⁺-induced gelation in alginates and pectins: the egg-box model revisited. *Biomacromolecules*, **2**, 1089-1096.
- Brown, P.H., Bellaloui, N., Wimmer, M.A., Bassil, E.S., Ruiz, J., Hu, H., Pfeffer, H., Dannel, F. and Römheld, V.** (2002) Boron in plant biology. *Plant Biol.*, **4**, 205–223.
- Brown, C.D., Rusek, M.S. and Kiessling, L.L.** (2012) Fluorosugar chain termination agents as probes of the sequence specificity of a carbohydrate polymerase. *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 6552–6555.
- Burkart, M.D., Vincent, S.P., Düffels, A., Murray, B.W., Ley, S.V. and Wong, C.-H.** (2000) Chemo-enzymatic synthesis of fluorinated sugar nucleotide: useful mechanistic Probes for glycosyltransferases. *Bioorg. Med. Chem.*, **8**, 1937–1946.
- Choi, S., Rusczycky, M.W., Zhang, H. and Liu, H.** (2011) A fluoro analogue of UDP- α -D-glucuronic acid is an inhibitor of UDP- α -D-apiose/UDP- α -D-xylose synthase. *Chem. Commun. Camb. Engl.*, **47**, 10130–10132.
- Chormova, D., Messenger, D.J. and Fry, S.C.** (2014) Boron bridging of rhamnogalacturonan-II, monitored by gel electrophoresis, occurs during polysaccharide synthesis and secretion but not post-secretion. *Plant J.*, **77**, 534–546.
- Dardelle, F., Le Mauff, F., Lehner, A., Loutelier-Bourhis, C., Bardor, M., Rihouey, C., Causse, M., Lerouge, P., Driouich, A. and Mollet, J.C.** (2015) Pollen tube cell walls of wild

and domesticated tomatoes contain arabinosylated and fucosylated xyloglucan. *Ann. Bot.*, **115**, 55–66.

Datema, R., Schwarz, R.T., Rivas, L.A. and Lezica, R.P. (1983) Inhibition of beta-1,4-glucan biosynthesis by deoxyglucose : The effect on the glucosylation of lipid intermediates. *Plant Physiol.*, **71**, 76–81.

Delmas, F., Séveno, M., Northey, J.G.B., Hernould, M., Lerouge, P., McCourt, P. and Chevalier, C. (2008) The synthesis of the rhamnogalacturonan II component 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid (Kdo) is required for pollen tube growth and elongation. *J. Exp. Bot.*, **59**, 2639–2647.

Dell, B. and Huang, L. (1997) Physiological response of plants to low boron. *Plant Soil.*, **193**, 103–120.

Deng, Y., Wang, W., Li, W.-Q., Xia, C., Liao, H.-Z., Zhang, X.-Q. and Ye, D. (2010) MALE GAMETOPHYTE DEFECTIVE 2, encoding a sialyltransferase-like protein, is required for normal pollen germination and pollen tube growth in Arabidopsis. *J. Integr. Plant Biol.*, **52**, 829–843.

Dugger, W.M. (1983) Boron in plant metabolism. In Lauchli, A. and Bielecki, R.L., eds, *Encyclopedia of Plant Physiology*, Vol 15B. Inorganic Plant Nutrition. Springer-Verlag, New York, 626–650.

Dumont, M., Lehner, A., Bouton, S., Kiefer-Meyer, M.C., Voxeur, A., Pelloux, J., Lerouge, P. and Mollet, J.-C. (2014) The cell wall pectic polymer rhamnogalacturonan-II is required for proper pollen tube elongation: implications of a putative sialyltransferase-like protein. *Ann. Bot.*, **114**, 1177–1188.

Dumont, M., Lehner, A., Marchant, A., Malassis, J., Linclau, B., Mouille, G., Vauzeilles, B., Anderson, C.T., Mollet, J.-C. and Lerouge, P. Plant cell wall imaging by metabolic click-mediated labelling of rhamnogalacturonan II using azido 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid analogue. (*submitted*)

Edmonds, M.K. and Peddie, V. (2006) Fluorinated analogues of biological molecules: accessing new chemical, physical and biological properties. *Chem N.Z.* **70**, 85-87.

Egelund, J., Petersen, B.L., Motawia, M.S., Damager, I., Faik, A., Olsen, C.E., Ishii, T., Clausen, H., Ulvskov, P. and Geshi N. (2006) *Arabidopsis thaliana* RGXT1 and RGXT2 encode Golgi-localized (1,3)-alpha-D-xylosyltransferases involved in the synthesis of pectic rhamnogalacturonan-II. *Plant Cell*, **18**, 2593–2607.

Egelund, J., Damager, I., Faber, K., Olsen, C.-E., Ulvskov, P. and Petersen, B.L. (2008) Functional characterisation of a putative rhamnogalacturonan II specific xylosyltransferase. *FEBS Lett.*, **582**, 3217–3222.

Faye, L., Gomord, V., Fitchette-Lainé, A.C. and Chrispeels, M.J. (1993) Affinity purification of antibodies specific for Asn-linked glycans containing alpha 1-->3 fucose or beta 1-->2 xylose. *Anal. Biochem.*, **209**, 104–108.

Ferrieri, A.P., Appel, H., Ferrieri, R.A. and Schultz, J.C. (2012) Novel application of 2-[18F]fluoro-2-deoxy-D-glucose to study plant defenses. *Nucl. Med. Biol.*, **39**, 1152–1160.

- Fleischer, A., O'Neill, M.A. and Ehwald, R.** (1999) The Pore Size of Non-Graminaceous Plant Cell Walls Is Rapidly Decreased by Borate Ester Cross-Linking of the Pectic Polysaccharide Rhamnogalacturonan II. *Plant Physiol.*, **121**, 829–838.
- Fry, S.C., York, W.S., Albersheim, P., Darvill, A., Hayashi, T., Joseleau, J.P., Kato, Y., Lorences, E.P., Maclachlan, G.A., McNeil, M., Mort, A.J., Grant Reid, J.S., Seitz, H.U., Selvendran, R.R., Voragen, A.G.J. and White, A.R.** (1993) An unambiguous nomenclature for xyloglucan-derived oligosaccharides. *Physiol. Plant.*, **89**, 1–3.
- Funakawa, H. and Miwa, K.** (2015) Synthesis of borate cross-linked rhamnogalacturonan II. *Front. Plant Sci.*, **6**,223.
- Glushka, J.N., Terrell, M., York, W.S., O'Neill, M.A., Gucwa, A., Darvill, A.G., Albersheim, P. and Prestegard, J.H.** (2003) Primary structure of the 2-O-methyl- α -L-fucose-containing side chain of the pectic polysaccharide, rhamnogalacturonan II. *Carbohydr. Res.*, **338**, 341–352.
- Gutierrez, L., Mongelard, G., Floková, K., Pacurar, D.I., Novák, O., Staswick, P., Kowalczyk, M., Pacurar, M., Demailly, H., Geiss, G. and Bellini, C.** (2012) Auxin controls Arabidopsis adventitious root initiation by regulating jasmonic acid homeostasis. *Plant Cell.*, **24**(6):2515-2527.
- Hajiboland, R., Farhanghi, F. and Aliasgharpour, M.** (2012) Morphological and anatomical modifications in leaf, stem and roots of four plant species under boron deficiency conditions.
- Hattori, E., Uchida, H., Harada, N., Ohta, M., Tsukada, H., Hara, Y. and Suzuki, T.** (2008) Incorporation and translocation of 2-deoxy-2-[18F]fluoro-D-glucose in *Sorghum bicolor* (L.) Moench monitored using a planar positron imaging system. *Planta*, **227**, 1181–1186.
- Hirsch, A.M. and Torrey, J.G.** (1980) Ultrastructural changes in sunflower root cells in relation to boron deficiency and added auxin. *Can. J. Bot.*, **58**, 856–866.
- Hoffman, M., Jia, Z., Peña, M.J., Cash, M., Harper, A., Blackburn II, A.R., Darvill, A. and York, W.S.** (2005) Structural analysis of xyloglucans in the primary cell walls of plants in the subclass Asteridae. *Carbohydr. Res.*, **340**, 1826–1840.
- Jaffe, M.J. and Leopold, A.C.** (1984) Callose deposition during gravitropism of *Zea mays* and *Pisum sativum* and its inhibition by 2-deoxy-D-glucose. *Planta*, **161**, 20–26.
- Keegstra, K. and Raikhel, N.** (2001) Plant glycosyltransferases. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **4**, 219–224.
- Kiefer, L., York, W., Darvill, A. and Albersheim, P.** (1989) Xyloglucan isolated from suspension-cultured sycamore cell walls is O-acetylated. *Phytochemistry* **28**, 2105–2107.
- Kobayashi, M., Matoh, T. and Azuma, J.I.** (1996) Two chains of rhamnogalacturonan II are cross-linked by borate-diol ester bonds in higher plant cell walls. *Plant Physiol.*, **110**, 1017–1020.
- Kunze, I., Ebnet, M., Heim, U., Geiger, M., Sonnewald, U. and Herbers, K.** (2001) 2-deoxyglucose resistance: a novel selection marker for plant transformation. *Mol. Breed.*, **7**, 221–227.
- Lampugnani, E.R., Moller, I.E., Cassin, A., Jones, D.F., Koh, P.L., Ratnayake, S., Beahan, C.T., Wilson, S.M., Bacic, A. and Newbiggin E.** (2013) *In vitro* grown pollen tubes of *Nicotiana glauca* actively synthesise a fucosylated xyloglucan. *PLoS ONE*, **8**, e77140.

- Leroux, C., Bouton, S., Kiefer-Meyer, M.C., Fabrice, T.N., Mareck, A., Guénin, S., Fournet, F., Ringli, C., Pelloux, J., Driouich, A., Lerouge, P., Lehner, A. and Mollet, J.-C.** (2015) PECTIN METHYLESTERASE48 is involved in Arabidopsis pollen grain germination. *Plant Physiol.* **167**, 367–380.
- Lerouxel, O., Choo, T.S., Séveno, M., Usadel, B., Faye, L., Lerouge, P. and Pauly, M.** (2002) Rapid structural phenotyping of plant cell wall mutants by enzymatic oligosaccharide fingerprinting. *Plant Physiol.*, **130**, 1754–1763.
- Liang, Y., Basu, D., Pattathil, S., Xu, W., Venetos, A., Martin, S.L., Faik, A., Hahn, M.G. and Showalter, A.M.** (2013) Biochemical and physiological characterization of *fut4* and *fut6* mutants defective in arabinogalactan-protein fucosylation in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.*, **64**, 5537–5551.
- Liu, X.-L., Liu, L., Niu, Q.-K., Xia, C., Yang, K.Z., Li, R., Chen, L.Q., Zhang, X.Q., Zhou, Y. and Ye, D.** (2011) Male gametophyte defective 4 encodes a rhamnogalacturonan II xylosyltransferase and is important for growth of pollen tubes and roots in Arabidopsis. *Plant J. Cell Mol. Biol.*, **65**, 647–660.
- Li, Y., Smith, C., Corke, F., Zheng, L., Merali, Z., Ryden, P., Derbyshire, P., Waldron, K. and Bevan, M.W.** (2007) Signaling from an altered cell wall to the nucleus mediates sugar-responsive growth and development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Online*, **19**, 2500–2515.
- López-Bucio, J., Cruz-Ramírez, A. and Herrera-Estrella, L.** (2003) The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **6**, 280–287.
- Martín-Rejano, E.M., Camacho-Cristóbal, J.J., Herrera-Rodríguez, M.B., Rexach, J., Navarro-Gochicoa, M.T. and González-Fontes, A.** (2011) Auxin and ethylene are involved in the responses of root system architecture to low boron supply in Arabidopsis seedlings. *Physiol. Plant.*, **142**, 170–178.
- Oiwa, Y., Kitayama, K., Kobayashi, M. and Matoh, T.** (2013) Boron deprivation immediately causes cell death in growing roots of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **59**, 621–627.
- Okeley, N.M., Alley, S.C., Anderson, M.E., Boursalian, T.E., Burke, P.J., Emmerton, K.M., Jeffrey, S.C., Klussman, K., Law, C.L., Sussman, D., Toki, B.E., Westendorf, L., Zeng, W., Zhang, X., Benjamin, D.R. and Senter, P.D.** (2013) Development of orally active inhibitors of protein and cellular fucosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **110**, 5404–5409.
- O’Neill, M.A., Warrenfeltz, D., Kates, K., Pellerin, P., Doco, T., Darvill, A.G. and Albersheim, P.** (1996) Rhamnogalacturonan-II, a pectic polysaccharide in the walls of growing plant cell, forms a dimer that is covalently cross-linked by a borate ester. In vitro conditions for the formation and hydrolysis of the dimer. *J. Biol. Chem.*, **271**, 22923–22930.
- O’Neill, M.A., Eberhard, S., Albersheim, P. and Darvill, A.G.** (2001) Requirement of borate cross-linking of cell wall rhamnogalacturonan II for Arabidopsis growth. *Science*, **294**, 846–849.
- O’Neill, M.A., Ishii, T., Albersheim, P. and Darvill, A.G.** (2004) Rhamnogalacturonan II: structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **55**, 109–139.
- Pauly, M., Qin, Q., Greene, H., Albersheim, P., Darvill, A. and York, W.S.** (2001) Changes in the structure of xyloglucan during cell elongation. *Planta*, **212**, 842–850.

- Perrin, R.M., Jia, Z., Wagner, T.A., O'Neill, M.A., Sarria, R., York, W.S., Raikhel, N.V. and Keegstra, K.** (2003) Analysis of xyloglucan fucosylation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **132**, 768–778.
- Puhlmann, J., Bucheli, E., Swain, M.J., Dunning, N., Albersheim, P., Darvill, A.G. and Hahn, M.G.** (1994) Generation of monoclonal antibodies against plant cell-wall polysaccharides. I. Characterization of a monoclonal antibody to a terminal alpha-(1->2)-linked fucosyl-containing epitope. *Plant Physiol.*, **104**, 699–710.
- Rajaratnam, J.A. and Lowry, J.B.** (1974). The role of boron in the oil-palm (*Elaeis guinensis*). *Ann. Bot.*, **38**, 193-200.
- Rayon C., Lerouge P. and Faye L.** (1998). The protein N-glycosylation in plants. *J. Exp. Bot.* **49**, 1463–1472.
- Rayon, C., Cabanes-Macheteau, M., Loutelier-Bourhis, C., Salliot-Maire, I., Lemoine, J., Reiter, W.-D., Lerouge, P. and Faye, L.** (1999) Characterization of *N*-glycans from *Arabidopsis*. Application to a fucose-deficient mutant. *Plant Physiol.*, **119**, 725–734.
- Reed, L.J. and Muench, H.** (1938) A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hygiene.* **27**, 493-497.
- Reiter, W.D., Chapple, C.C.S. and Somerville, C.R.** (1993) Altered growth and cell walls in a fucose-deficient mutant of *Arabidopsis*. *Science.* **261**,1032–1035
- Rillahan, C.D., Antonopoulos, A., Lefort, C.T., Sonon, R., Azadi, P., Ley, K., Dell, A., Haslam, S.M. and Paulson, J.C.** (2012) Global metabolic inhibitors of sialyl- and fucosyltransferases remodel the glycome. *Nat. Chem. Biol.*, **8**, 661–668.
- Schaewen, A. von, Sturm, A., O'Neill, J. and Chrispeels, M.J.** (1993) Isolation of a mutant *Arabidopsis* plant that lacks *N*-acetyl glucosaminyl transferase I and is unable to synthesize Golgi-modified complex *N*-linked glycans. *Plant Physiol.*, **102**, 1109–1118.
- Scheible, W.-R. and Pauly, M.** (2004) Glycosyltransferases and cell wall biosynthesis: novel players and insights. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **7**, 285–295.
- Schwarz, R.T. and Datema, R.** (1980) Inhibitors of protein glycosylation. *Trends Biochem. Sci.*, **5**, 65–67.
- Smyth, K.M., Mikolajek, H., Werner, J.M. and Marchant, A.** (2013) 2 β -deoxy-Kdo is an inhibitor of the *Arabidopsis thaliana* CMP-2-Keto-3-deoxymanno-octulosonic acid synthetase, the enzyme required for activation of Kdo prior to incorporation into rhamnogalacturonan II. *Mol. Plant*, **6**, 981–984.
- Strasser, R., Altmann, F., Mach, L., Glössl, J. and Steinkellner, H.** (2004) Generation of *Arabidopsis thaliana* plants with complex *N*-glycans lacking β 1,2-linked xylose and core α 1,3-linked fucose. *FEBS Lett.*, **561**, 132–136.
- Som, P., Atkins, H.L., Bandyopadhyay, D., Fowler, J.S., MacGregor, R.R., Matsui, K., Oster, Z.H., Sacker, D.F., Shiue, C.Y., Turner, H., Wan, C.N., Wolf, A.P. and Zabinski, S.V.** (1980) A fluorinated glucose analog, 2-fluoro-2-deoxy-D-glucose (F-18): nontoxic tracer for rapid tumor detection. *J Nucl Med.* **21**, 670-675.
- Tessier, D.C., Thomas, D.Y., Khouri, H.E., Laliberté, F. and Vernet T.** (1991) Enhanced secretion from insect cells of a foreign protein fused to the honeybee melittin signal peptide. *Gene.* **98**,177-83.

- Toki, D., Sarkar, M., Yip, B., Reck, F., Joziase, D., Fukuda, M., Schachter, H. and Brockhausen, I.** (1997) Expression of stable human *O*-glycan core 2 beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase in Sf9 insect cells. *Biochem J.* **325**, 63-9.
- Tryfona, T., Liang, H.-C., Kotake, T., Tsumuraya, Y., Stephens, E. and Dupree, P.** (2012) Structural characterization of Arabidopsis leaf arabinogalactan polysaccharides. *Plant Physiol.*, **160**, 653–666.
- Vanzin, G.F., Madson, M., Carpita, N.C., Raikhel, N.V., Keegstra, K. and Reiter, W.-D.** (2002) The *mur2* mutant of *Arabidopsis thaliana* lacks fucosylated xyloglucan because of a lesion in fucosyltransferase AtFUT1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**, 3340–3345.
- Voxeur, A., Gilbert, L., Rihouey, C., Driouich, A., Rothan, C., Baldet, P. and Lerouge, P.** (2011) Silencing of the GDP-D-mannose 3,5-epimerase affects the structure and cross-linking of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II and plant growth in tomato. *J. Biol. Chem.*, **286**, 8014–8020.
- Voxeur, A., André, A., Breton, C. and Lerouge, P.** (2012) Identification of putative rhamnogalacturonan-II specific glycosyltransferases in Arabidopsis using a combination of bioinformatics approaches. *PloS One*, **7**, e51129.
- Voxeur, A. and Fry, S.C.** (2014) Glycosylinositol phosphorylceramides from *Rosa* cell cultures are boron-bridged in the plasma membrane and form complexes with rhamnogalacturonan II. *Plant J.*, **79**, 139–149.
- Warrington, K.** (1923) The effect of boric acid and borax on the broad bean and certain other plants. *Ann. Bot.* **37**, 629-672.
- Wimmer, M.A., Lochnit, G., Bassil, E., Mühling, K.H. and Goldbach, H.E.** (2009) Membrane-associated, boron-interacting proteins isolated by boronate affinity chromatography. *Plant Cell Physiol.* **50**, 1292–1304.
- Wolf, S., Mouille, G. and Pelloux, J.** (2009) Homogalacturonan methyl-esterification and plant development. *Mol. Plant*, **2**, 851–860.
- York, W.S., Kumar Kolli, V.S., Orlando, R., Albersheim, P. and Darvill, A.G.** (1996) The structures of arabinoxyloglucans produced by solanaceous plants. *Carbohydr. Res.*, **285**, 99–128.
- Zabackis, E., Huang, J., Müller, B., Darvill, A.G. and Albersheim, P.** (1995) Characterization of the cell-wall polysaccharides of *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant Physiol.*, **107**, 1129–1138.

Acknowledgments : This work was supported by the University of Rouen and the “Trans Channel Wallnet” project that has been selected in the context of the INTERREG IVA France (Channel) – England European cross-border cooperation programme, which is co-financed by the ERDF. Images were obtained on PRIMACEN (<http://www.primacen.fr>), the Cell Imaging Platform of Normandy, IRIB, Faculty of Sciences, University of Rouen, 76821 Mont-Saint-Aignan, France. Authors thank Alan Marchant (University of Southampton, UK) for providing *pCYCB1::GUS Arabidopsis* seeds, Marie-Christine Ralet (INRA, Nantes, France) for gift of lemon RG-II, and Aline Voxeur for technical advices.

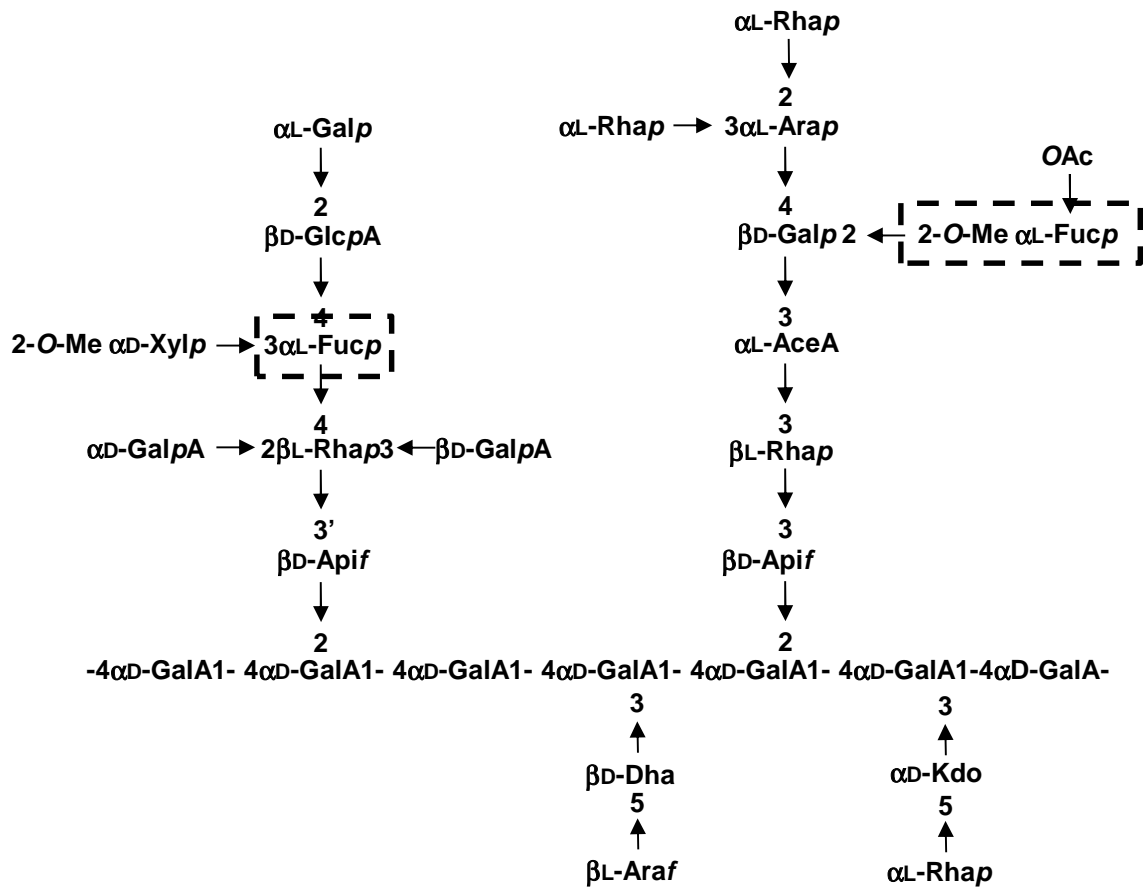
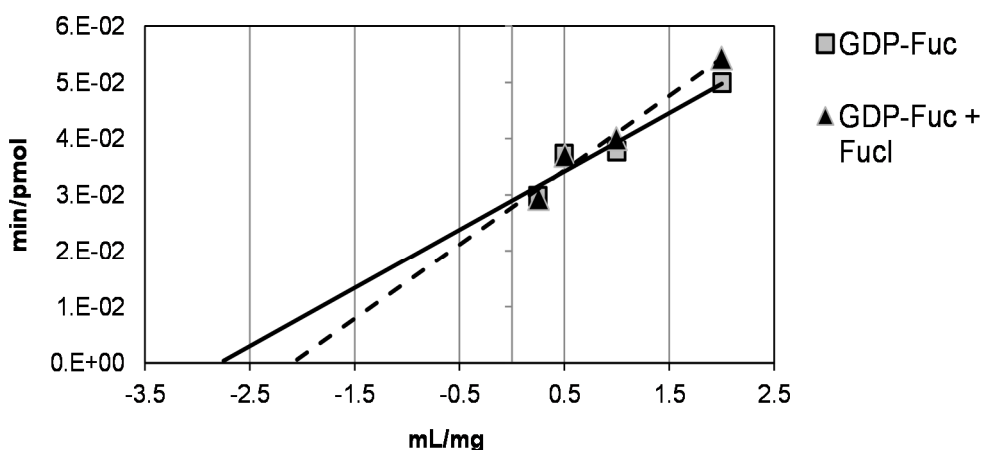


Figure S1: Structure of rhamnogalacturonan II.

Fucose residues are indicated in dashed squares.



Kinetics parameters of AtFUT1	GDP-Fuc (control)	GDP-Fuc + 2F-Fuc
Km value for XyG (mg/mL)	0.409	0.544
Ki value (mM)	-	3

Figure S2 : Inhibition of AtFUT1 fucosyltransferase activity by 2F-Fuc.

AtFUT1 activity toward tamarin XyG was evaluated using 30 μ M GDP-[14 C]fucose. Affinity of AtFUT1 toward tamarin XyG decreased (-33%) in presence of 1 mM 2F-Fuc and a K_i value of 3 mM was calculated for inhibition of AtFUT1 activity by 2F-Fuc.

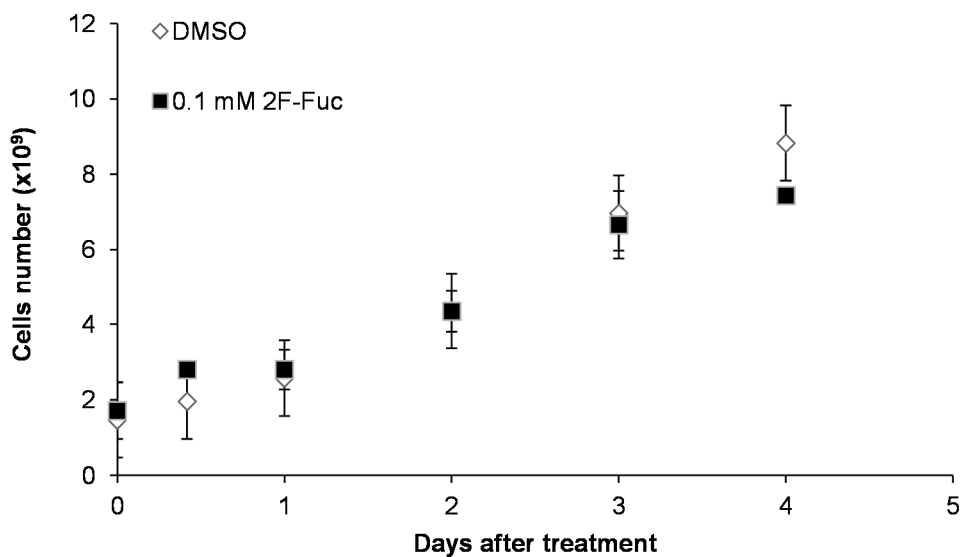


Figure S3: Effect of 2F-Fuc on BY-2 cell division.

Four-day-old BY-2 cells were incubated with 0.1 mM 2F-Fuc or 1% DMSO (control). No significant difference was found between treatments (Mann-Whitney, $p > 0.05$). Data are mean \pm SEM of three measurements ($n > 500$ cells).

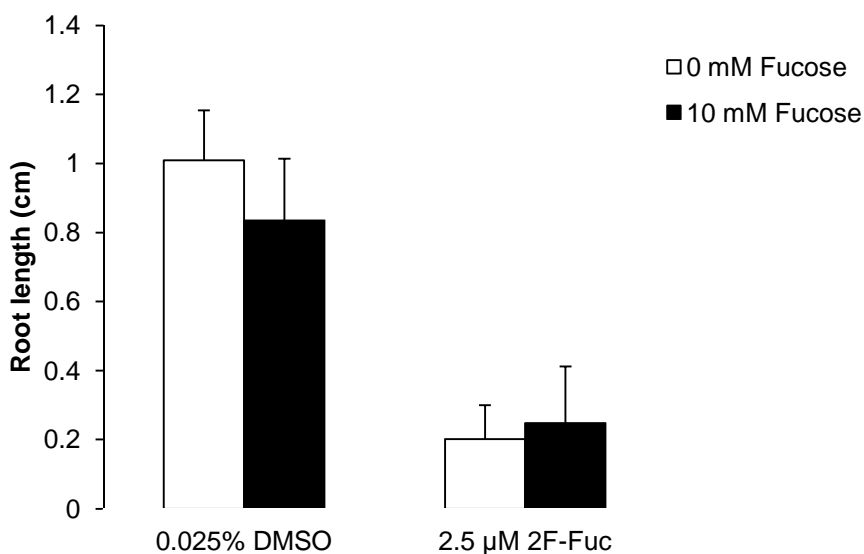


Figure S4: Excess of fucose doesn't restore the inhibitory effect of 2F-Fuc.

Root length of 4-day-old *Arabidopsis* seedlings treated with 2.5 μ M 2F-Fuc, 10 mM fucose or both. DMSO: negative control. Data are mean \pm SEM ($n > 25$ seedlings). No significant difference was observed between conditions with or without 10 mM fucose. Mann-Whitney test.

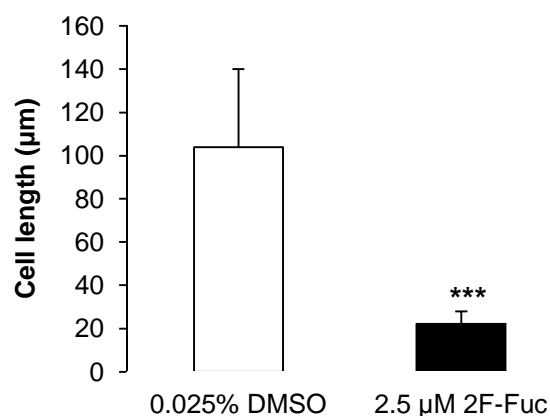


Figure S5: Effect of 2F-Fuc on cell elongation.

Length of the cells in the elongation zone of 4-day-old Arabidopsis seedlings treated with 2.5 µM 2F-Fuc or not (0.025% DMSO). Values are mean ± SEM (n > 70 cells from at least 12 roots). Unpaired t-test, *** p < 0.001.

Table S1: Monosaccharide composition (mol%) of root cell walls of control (0.25 % DMSO) and 2.5 to 25 µM 2F-Fuc treated seedlings determined by gas chromatography. Data are mean ± SEM of three biological replicates.

Monosaccharide	0.25 % DMSO	2.5 µM 2F-Fuc	10 µM 2F-Fuc	25 µM 2F-Fuc
Ara	16.3 +/- 2	17.5 +/- 3	19.5 +/- 2	16.4 +/- 2
Rha	9.3 +/- 0.5	8.4 +/- 1	8.3 +/- 1.5	7.8 +/- 1.5
Fuc	3.1 +/- 1	0.7 +/- 0.4	< 0.25	< 0.25
Xyl	20.6 +/- 1.5	16.4 +/- 2.5	16 +/- 3	14.8 +/- 2
GlcA	0.6 +/- 0.1	0.5 +/- 0.1	0.5 +/- 0.1	0.5 +/- 0.1
GalA	24.8 +/- 1	24.3 +/- 3	21.7 +/- 2	23.2 +/- 3
Man	2.9 +/- 0.5	3.5 +/- 0.5	3.0 +/- 0.5	3.2 +/- 0.5
Gal	22.4 +/- 2	27.4 +/- 3	31.0 +/- 4	33.7 +/- 2

Résultats complémentaires : effets du 2F-Fuc sur la croissance du tube pollinique d'*Arabidopsis*.

Comme indiqué dans l'introduction, le tube pollinique est un modèle adapté à l'étude de l'élongation cellulaire. Ainsi, nous avons testé l'effet du 2F-Fuc sur la croissance du tube pollinique d'*Arabidopsis*. La forme peracétylée n'avait aucun effet sur l'élongation, ainsi il a fallu procéder à une étape de déacétylation. Ceci peut s'expliquer par une absence potentielle d'enzymes estérases dans le cytosol du tube pollinique qui permettent de dé-acétyler les analogues fluorés avant leur activation en nucléotide-sucres. L'ajout de 2F-Fuc au milieu de culture du pollen inhibe significativement la croissance du tube pollinique dès 10 μ M et engendre une augmentation du taux d'explosion des tubes (14% en conditions normales contre 32% en présence de 20 μ M de 2F-Fuc) (Fig. 35).

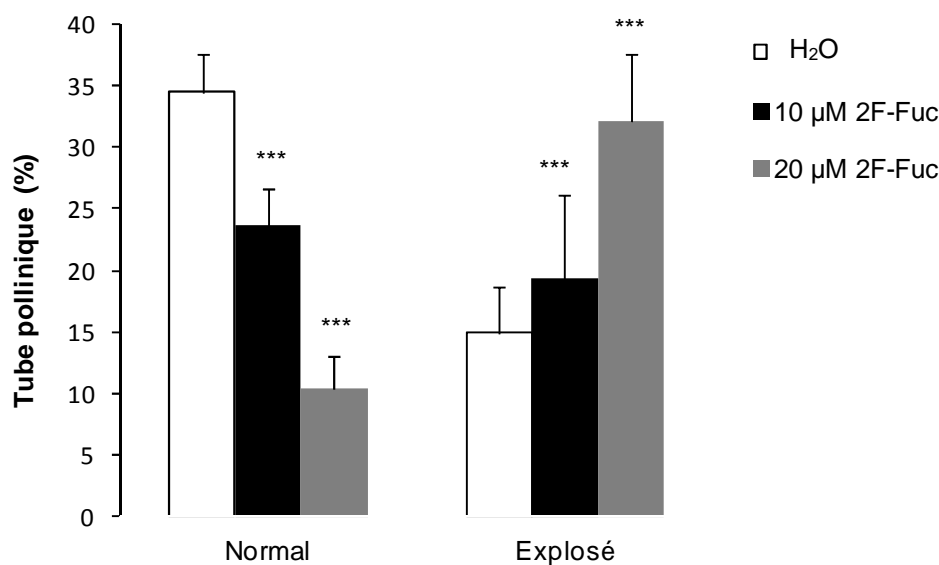
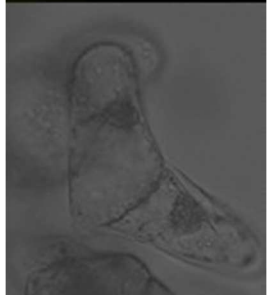
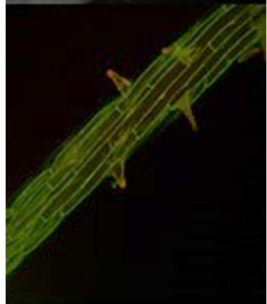
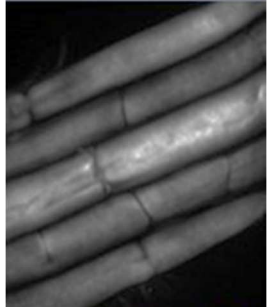
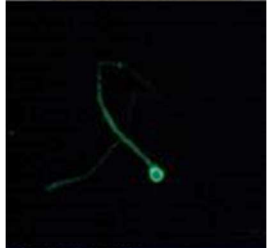
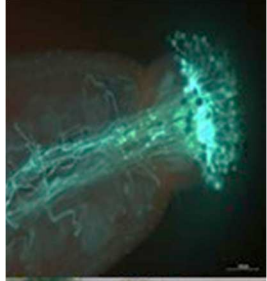


Figure 35 : Effet du 2F-Fuc sur la croissance du tube pollinique d'*Arabidopsis*. Analyse du taux de germination du pollen après 6 h de culture en milieu liquide. Les données expriment la moyenne de trois expériences indépendantes (n>1500 grains de pollen par expérience), test de student.



III-MATERIEL

ET

METHODES

1. Matériel biologique et conditions de culture

1. Matériel végétal

Les graines d'*Arabidopsis thaliana* utilisées pour ces travaux sont, sauf indication, d'écotype Columbia (Col-0). Les graines mutées par l'insertion d'un ADN-T dans leur génome ou par méthode chimique, sont issues du centre NASC (Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre) et proviennent des collections SALK (SALK Institute Genomic Analysis Laboratory, SIGNAL, Etats-Unis) et SAIL (Syngenta *Arabidopsis* Insertion Library). Pour le gène *SIA2*, deux lignées mutantes ont été sélectionnées : le mutant SALK_059690, nommé *sia2-1* et le mutant SAIL-259-H07, nommé *qrt1xsia2-2*. Pour le mutant *mur2* (At2g03220), qui est un mutant chimique, les graines ont été obtenues du centre NASC (N8565).

Les graines du mutant quartet ont été fournies par Mark Johnson (Brown university), le mutant *cgl* par CT Anderson (Pennsylvania State university), et les graines pCYCB1::GUS proviennent d'Alan Marchant (Southampton university).

Des graines de tomate cerise (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* WVA 106), fournies par Pierre Baldet (laboratoire de Biologie du Fruit et Pathologie, UMR 1332, INRA Bordeaux), et des graines de tabac (*Nicotiana benthamiana*) ont également été utilisées lors de ces études.

Une partie des expériences a été menée sur des suspensions cellulaires de tabac *Nicotiana tabacum* L. cv Bright Yellow -2 (BY-2).

2. Culture *in vitro*

Arabidopsis : Sous hotte, des graines sont placées dans un tube Eppendorf et immergées 5 min dans une solution d'éthanol à 50%. Puis, l'éthanol est remplacé par une solution d'hypochlorite de sodium à 30% (v/v) pendant 2 min. Les graines sont rincées ensuite six fois avec de l'eau distillée stérile. Deux milieux de culture sont utilisés pour la culture *in vitro* d'*Arabidopsis*, selon l'expérience envisagée. Le milieu *Arabidopsis* (Duchefa Biochemie) est préparé à raison de 11,82 g.L⁻¹ en présence de 2 mM de Ca(NO₃)₂. Le pH du milieu est ajusté à 5,8 par du KOH. Le milieu de culture de Murashige and Skoog (MS, Duchefa-Biochemie) est utilisé au demi (2,2 g.L⁻¹) et son pH est ajusté à 5,6 par ajout de KOH. 0,8% (p/v) de Vitro Agar (Kalys) sont ajoutés au milieu avant stérilisation à l'autoclave (120 °C, 20 min, 1 bar). Du

saccharose, 1% (p/v) est ajouté au milieu MS après stérilisation. Dans le cas des tests de l'effet d'analogues de sucres sur la croissance des plantes, les molécules sont ajoutées au milieu de culture, à la concentration désirée, avant d'être coulé dans des boîtes de Pétri.

Les graines sont semées sur milieu de culture puis les boîtes de Pétri sont placées 48 h à 4°C pour stratifier les graines. Elles sont ensuite placées verticalement en chambre de culture maintenue à 21°C, avec une photopériode 16 h jour ($120 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) / 8 h nuit.

Tomate et tabac: Les graines de tomate cerise et de tabac sont stérilisées de façon similaire aux graines d'*Arabidopsis* puis semées exclusivement sur milieu MS supplémenté avec 1% de saccharose.

BY-2 : Les suspensions cellulaires de BY-2 sont cultivées dans un milieu BY-2 liquide constitué de milieu MS à $4,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; 3% (p/v) saccharose ; $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$; $51 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ myo-inositol ; $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ thiamine et $0,22 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ acide 2,4 dichlorophénoxyacétique. Le pH du milieu est ajusté à 5,6-5,8 avec une solution molaire de KOH puis stérilisé. Chaque semaine, 10 mL de suspension sont repiquées dans 150 mL de milieu BY-2 frais, en conditions aseptiques. Les cultures sont placées à l'obscurité, à 24°C sous agitation permanente (140 rpm).

3. Culture en terre

La culture des plantes s'effectue par semis des graines sur de la terre stérile (autoclavée pendant 30 min à 120°C, 1 bar) contenue dans des bacs. Les cultures ont lieu dans des phytotrons respectant une photopériode de 16 h jour/8 h nuit. La température y est de 20°C en période de jour et de 16°C lors de la période de nuit pour la culture d'*Arabidopsis* et de 25°C et 22°C pour la tomate et le tabac. L'hygrométrie est maintenue à 60% et les plantes sont arrosées tous les deux jours.

4. Culture *in vitro* du pollen en milieu liquide

Arabidopsis : 40 fleurs d'*Arabidopsis* ouvertes le jour-même sont récoltées et placées dans 1 mL de milieu de germination (5 mM CaCl_2 ; 0,01% H_3BO_3 ; 1 mM MgSO_4 ; 5 mM KCl ; 10% (p/v) saccharose ; pH 7,5). Le tube est agité et vortexé pendant 5 min de manière à libérer le pollen des anthères. La densité de pollen relâché est vérifiée au microscope inversé, puis tous les résidus floraux sont retirés à l'aide d'une paire de pinces fines. La culture est centrifugée

pendant 7 min à 3 200 g. Un culot jaune, correspondant aux grains de pollen, est visible. Le surnageant est éliminé et 250 µL de milieu de germination sont ajoutés pour resuspendre le pollen. Le tube est ensuite placé horizontalement dans une étuve à 22°C pendant 6 h, à l'obscurité, sans agitation. Ce protocole de culture *in vitro* spécifique au pollen d'*Arabidopsis* a été optimisé par Boavida & McCormick (2007).

Tomate et tabac: Une fleur, récoltée au stade anthèse et débarrassée des pétales et sépales, est placée dans un pilulier de verre avec 1 mL de milieu de germination BK (Brewbaker et Kwack, 1963) constitué de 1,62 mM H₃BO₃ ; 1,27 mM Ca(NO₃)₂ 4H₂O ; 2,97 mM KNO₃ et 0,87 mM MgSO₄ 7H₂O contenant 10% (p/v) de saccharose. Le pilulier est agité pour libérer le pollen des anthères, puis la fleur est retirée du milieu. Après 6 h de culture à température ambiante sous agitation de 5 oscillations/min et à l'obscurité, le taux de germination est vérifié au microscope.

Les tubes polliniques utilisés dans le but d'une étude par immunomarquage sont fixés avec un volume de solution de fixation (100 mM PIPES buffer pH 6,9 ; 4 mM MgSO₄ 7H₂O ; 4 mM EGTA ; 10% (p/v) saccharose ; 4% (v/v) paraformaldéhyde). Tandis que les tubes polliniques utilisés pour des analyses de biochimie sont fixées par ajout de 3 volumes d'éthanol absolu. Après fixation, les cultures sont stockées à 4°C.

5. Souches bactériennes et agrobactéries

Des souches d'*Escherichia coli* compétentes DH5α (subcloning efficiencyTM, Invitrogen), c'est-à-dire capables d'incorporer un ADN étranger et de le multiplier, ont été utilisées pour amplifier le plasmide pBI101.3 (fourni par l'*Arabidopsis Biological Resource Center*) contenant l'ADNc du gène At3g48820 (U19220, fourni par l'*Arabidopsis Biological Resource Center*) sous le contrôle du promoteur pollen-spécifique PPE50 (promoteur du gène At5g07410, Louvet *et al.*, 2006).

La complémentation des plantes *qrt1xsia2-2+/-* a été obtenue par transformation *via Agrobacterium tumefaciens*. La souche d'agrobactérie qui a été utilisée est EHA105 contenant le plasmide pEHA105 (Hood *et al.*, 1993), résistante à l'antibiotique rifampycine. Elle se multiplie à 28°C dans un bouillon de culture lysogène (LB, 10 g.L⁻¹ de tryptone ; 5 g.L⁻¹ d'extrait de levure ; 10 g.L⁻¹ de NaCl).

6. Milieu de culture des bactéries

Préculture : Une colonie bactérienne est placée dans 5 mL de milieu LB supplémenté avec le(s) antibiotique(s) de sélection (à une concentration finale de 25-50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) et incubée 8 h à 37°C sous agitation (300 rpm).

Culture en milieu liquide : 100 μL de préculture sont ajoutés à 100 mL de milieu LB (plus les antibiotiques de sélection). La culture est placée à 37°C durant une nuit, sous agitation (300 rpm).

Culture en milieu solide : les bactéries sont étalées en boîte de Pétri sur un milieu LB solide (milieu LB additionné de 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ agar bactériologique) contenant l' (les) antibiotique(s) de sélection.

Stockage : 500 μL d'une préculture bactérienne sont conservées dans du glycérol 50% stérile (v/v) puis placées à -80°C.

2. Techniques de biologie moléculaire

1. Extraction et analyse de l'ADN génomique

a. Extraction d'ADN génomique

L'analyse génomique des plantes sauvages et mutantes s'effectue à partir d'une feuille prélevée sur une plante de 3 semaines environ. La feuille est placée dans un tube Eppendorf stérile contenant 400 μL de tampon d'extraction [200 mM Tris-HCl pH 8 ; 250 mM NaCl ; 25 mM EDTA ; 0,5% SDS (p/v)] et broyée à l'aide d'un micro-pilon en plastique stérile. Le tube est centrifugé 1 min à 16 000 g (à température ambiante) puis 350 μL du surnageant sont transférés dans un nouvel Eppendorf. Un volume d'isopropanol est ajouté, le tube est agité par retournement et une incubation de 5 min à température ambiante permet de précipiter l'ADN. Après une centrifugation de 5 min à 16 000 g, le culot est lavé à deux reprises par ajout de 40 μL d'EtOH à 70%. Le culot est séché sous hotte, puis repris dans 100 μL d'eau stérile et incubé 5 min à 65°C puis conservé à -20°C. 2 μL de l'extrait d'ADN sont utilisés pour la réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

b. Extraction d'ADN plasmidique

Selon la quantité de plasmide à extraire, deux méthodes d'extractions sont proposées. Pour de petites quantités (jusqu'à 15 µg d'ADN purifié) nous utilisons la miniprep tandis que la midiprep est réservée à des quantités plus importantes (jusqu'à 400 µg d'ADN purifié).

-Minipréparation : Elle est préparée à l'aide du kit *PureYield™ Plasmid Miniprep System* (Promega).

-Midipréparation : l'ADN est extrait à partir de 100 mL de culture avec le kit *Nucleobond® Xtra Midi* (Macherey-Nagel).

Les extractions sont réalisées suivant les recommandations données par le fournisseur.

c. Analyse de l'ADN par PCR

Le génotype des plantes *sia2-1+/-* ou encore des bactéries, est confirmé par PCR. Un milieu réactionnel est préparé, composé des amorces sens et antisens spécifiques du fragment d'ADN à amplifier (tableau en annexe p 251), de dNTP (désoxynucléotide 5' triphosphate), de l'enzyme ADN polymérase (GoTaq®, Promega) et de son tampon (Promega®) (**Fig. 36A**). Vingt µL du milieu réactionnel sont transférés dans un microtube de 500 µL et 2 µL de l'ADN (ou une colonie bactérienne) à cribler est ajouté. Les paramètres des cycles PCR sont déterminés en fonction de la température d'hybridation des amorces et de la longueur du fragment à amplifier (**Fig. 36B**).

d. Electrophorèse d'ADN

L'ADN (12 µL) est analysé par électrophorèse en gel d'agarose [0,6 à 1,5% (p/v) selon la taille du produit] préparé dans un tampon TBE (45 mM Tris-Borate pH 8 ; 1 mM EDTA) et contenant 100 ng.mL⁻¹ de bromure d'éthidium (BET) (alternativement, du Gel Green (VWR) ou du SafeView (Gentaur) ont été utilisés dans les conditions données par les fournisseurs). Les échantillons sont mélangés à 0,2 volume de tampon de charge [0,25% bleu de bromophénol (p/v) ; 0,25% xylène cyanol (p/v) ; 30% de glycérol (v/v)] avant d'être déposés dans les puits du gel d'agarose (excepté pour les produits PCR). La migration s'effectue pendant 20-30 min à 100 V et l'ADN est visualisé sous lumière ultra-violette (UV, λ=312 nm). Un marqueur de poids moléculaire (Smart Ladder, Eurogentec), permet d'évaluer la taille des produits PCR.

A

Produit	Concentration initiale	Concentration finale	Volume (µL/ réaction)
Green GoTaq [®] reaction buffer	5X	1X	4
dATP,dGTP,dCTP,dTTP	2,5 mM chacun	0,2 mM	1,6
Amorce sens	10 µM	0,2 µM	0,4
Amorce antisens	10 µM	0,2 µM	0,4
H ₂ O bi-distillée	-	-	13,5
GoTaq [®] ADN polymérase	5 U/µL	0.025 U/µL	0,1

B

Etape	Température	Durée	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	95°C	5 min	1
Dénaturation	95°C	1 min	35
Hybridation	42-62°C*	1 min	
Elongation	72°C	1 min / kb	
Elongation finale	72°C	5 min	1
Conservation	15°C	∞	1

Figure 36 : Conditions utilisées pour la PCR. A. Préparation du milieu réactionnel. B. Paramètres de la réaction. *La température d'hybridation est adaptée au couple d'amorces utilisées.

2. Analyse de l'expression du gène *SIA2*.

a. Extraction d'ARN totaux

Les acides ribonucléiques (ARN) totaux sont extraits à partir de 40 inflorescences de plantes d'*Arabidopsis* sauvage, de *quartet1*, *sia2-1+/-* et *qrt1xsia2-2+/-* âgées de 6 semaines. L'extraction est effectuée avec le kit NucleoSpin[®] RNA Plant (Macherey-Nagel) selon les instructions du fournisseur avec quelques modifications. Une étape d'incubation du matériel biologique de 5 min dans 1 mL de phénol (Izol-RNA Lysis Reagent[™]) suivie d'une homogénéisation de 4 fois 30 sec au FastPrep[®]-24 (MP Biomedicals) sont effectuées. Les échantillons sont centrifugés 5 min à 14 000 g (température ambiante) et le surnageant est transféré dans un tube eppendorf de 2 mL (« ribonucléase free »). 200 µL de chloroforme sont ajoutés dans chaque tube, les échantillons sont homogénéisés par retournement et incubés 3 min (température ambiante). Après centrifugation (15 min, 12 000 g, 4°C), les phases aqueuses

supérieures sont déposées dans un nouveau tube avec 1 volume d'EtOH à 70% (v/v). Puis l'ensemble (700 µL) est transféré sur la membrane de la colonne Nucleospin® RNA II du kit. La colonne est centrifugée 30 sec à 8 000 g (cette étape est effectuée en deux fois si le volume de surnageant excède 700 µL). La colonne est transférée sur un nouveau tube collecteur. Un dessalage de la membrane est réalisé en ajoutant 350 µL de tampon MDB (*Membrane desalting buffer*) du kit sur la membrane et d'une centrifugation d'1 min à 11 000 g. Puis, l'ADN génomique est digéré par une incubation de 20 min de la membrane dans 95 µL d'un mélange de rDNase (désoxyribonucléase recombinante fournie dans le kit) et de tampon préparé selon les recommandations du fournisseur. Pendant l'incubation, le tube est laissé ouvert. Plusieurs lavages sont effectués avec les tampons du kit. Le premier lavage avec 500 µL de tampon RAW2 inactive l'enzyme rDNase, est suivi de deux lavages avec 500 µL de tampon RA3. Les tampons de lavage sont élués par centrifugation d'1 min à 8 000 g. La membrane est séchée par centrifugation de 2 min à 14 000 g. La colonne est transférée sur un tube eppendorf pour l'éluion finale, réalisée avec 40 µL d'eau (« RNase free ») placées au centre de la membrane pendant 1 min avant d'éluier par centrifugation d'1 min à 11 000 g. L'ARN est conservé à –80°C.

Les ARN sont quantifiés au spectrophotomètre Nanodrop ND 2000C (Thermo Scientific) qui indique les rapports A_{260}/A_{280} , A_{260}/A_{230} et la concentration en acides nucléiques ($\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) de l'échantillon. Un rapport A_{260}/A_{280} égal à 2 témoigne d'un ARN “pur”, dépourvu de protéines. Le rapport A_{260}/A_{230} permet de vérifier l'absence de contaminations, telles que l'EDTA, les sucres ou les phénols. Il doit être compris entre 1,8 et 2,2.

b. Transcription inverse et analyse de PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR)

Une quantité de 400 ng d'ARN est alors traitée de nouveau à la désoxyribonucléase et convertie en ADNc à l'aide du kit QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) en suivant les instructions du fournisseur. La qualité des ADNc obtenus (présence d'ADN génomique résiduel) est vérifiée par PCR en utilisant les couples d'amorces utilisés ultérieurement pour l'analyse de PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR).

La RT-qPCR repose sur la mesure de fluorescence du SYBR Green (Roche), qui émet de la fluorescence lorsqu'il est intercalé entre deux brins d'ADN complémentaires. Cette technique permet de suivre la quantité d'ADN cible amplifié par PCR en temps réel grâce à l'incorporation du marqueur fluorescent. L'expérience est réalisée en plaque de 384 puits et l'appareil utilisé est le LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche). La composition du

milieu réactionnel et les paramètres de la réaction sont présentés dans la **figure 37**. Le nombre de cycles à partir duquel le produit PCR est détectable et supérieur à une valeur seuil, nommé cycle seuil (ou CP : « crossing point »), est déterminé pour chaque échantillon grâce au logiciel LightCycler® 480 (Roche, version 1.5) en utilisant la méthode de la dérivée seconde maximale. Cette valeur est indispensable à la quantification de l'ADNc présent initialement dans l'échantillon et permet donc de quantifier l'expression du gène étudié.

Les amorces spécifiques de chaque gène ont été conçues grâce au programme « NCBI Primer blast » (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>). Les couples d'amorces sont choisis de préférence de part et d'autre d'un intron ou dans les régions non traduites UTR de la séquence d'intérêt en imposant les critères conseillés par Arvidsson *et al.*, (2008), permettant une meilleure spécificité des amorces : une température de fusion (T_m , température à laquelle 50% de l'ADN double-brin est dissocié) : $64 \pm 3^\circ\text{C}$; un taux en base G et C : 45 à 55% et une longueur des amorces : 20 à 24 nucléotides. Pour la RT-qPCR, il faut également veiller à ce que la taille des amplicons soit inférieure à 150 paires de bases (pb) pour une efficacité optimale de l'amplification et supérieure à 75 pb afin de pouvoir les distinguer des éventuels dimères d'amorces. L'efficacité de chaque couple d'amorces, nécessaire pour la quantification, est testée en réalisant une PCR quantitative sur une gamme de dilution d'ADNc ($1/20^e$, $1/60^e$, $1/180^e$, $1/540^e$, $1/1620^e$). La quantification est effectuée en duplicat pour chaque dilution puis le logiciel reporte la moyenne des cycles seuils obtenus dans un graphique semi-logarithmique en fonction de la concentration en ADNc. La pente (a) de la régression linéaire du graphique est utilisée pour calculer l'efficacité selon la formule :

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

L'efficacité devrait être égale à 100%, c'est-à-dire que la quantité d'ADN est doublée à chaque cycle, dans le cas où $a = -3,32$, ainsi $E = 1,00$ et $E + 1 = 2,00$. Seules les amorces qui ont une efficacité supérieure à 80% ou une valeur de $(E + 1)$ supérieure à 1,8 sont sélectionnées pour quantifier l'expression des gènes cibles et des gènes de référence. Le cycle seuil pour un gène est déterminé en duplicat dans chaque échantillon pour un couple d'amorce donné, puis l'expression du gène est déterminée grâce à la formule suivante :

$$(1 / E_c^{CP_c}) / (1 / E_r^{CP_r}) \text{ soit } E_r^{CP_c} / E_c^{CP_r}$$

avec E_r = Efficacité du gène de référence+1, E_c = Efficacité du gène cible+1.

Un autre paramètre important à vérifier avant toute quantification est le nombre de produit

PCR amplifié par puits. Un seul produit PCR doit être amplifié et ceci est vérifié grâce à la courbe de fusion (« melting curve ») obtenue à la troisième étape du programme, pendant laquelle l'intensité de la fluorescence est mesurée en fonction de l'augmentation de la température. Ainsi, si le produit de PCR amplifié est unique, la courbe de fusion ne présentera qu'un seul pic dont la température maximale correspond à la température de fusion spécifique du produit PCR.

A

Produit	Concentration initiale	Concentration finale	Volume (µL/ réaction)
Lightcycler® 480 SYBR Green I Master (Roche)	2X	1X	5
Amorce sens	10 µM	0,5 µM	0,5
Amorce antisens	10 µM	0,5 µM	0,5
H ₂ O bi-distillée stérile	-	-	1,5
ADNc dilué au 1/20e	-	-	2,5

B

Etape	Température	Durée	Nombre de cycles
Activation de la Taq polymérase et dénaturation de l'ADNc	95°C	10 min	1
Amplification	95°C	10 sec	45
	60°C	15 sec	
	72°C	20 sec	
Fusion	95°C	10 sec	1
	65°C	1 min	
	97°C	fin de cycle	
Refroidissement	40 °C	30 sec	1

Figure 37 : Conditions utilisées pour la RT-qPCR. A. Composition du milieu réactionnel. B. Etapes de la réaction.

Dans cette étude, des RT-qPCR ont été effectuées sur des ADNc obtenus à partir d'inflorescences afin de comparer l'expression du gène *SIA2* chez les plantes hétérozygotes par rapport à celle des plantes sauvages. Les analyses ont été effectuées sur trois lots d'ARN extraits de façon indépendante.

Trois gènes de référence (At3g28750, At3g57690, At5g59370), c'est-à-dire exprimés de manière stable dans nos échantillons biologiques, ont été sélectionnés à l'aide du logiciel GeNorm (Vandesompele *et al.*, 2002). Ils sont utilisés en tant que contrôles internes et permettent de calculer d'expression relative de chaque gène d'intérêt, selon la méthode décrite par Gutierrez *et al.* (2009).

Les séquences des couples d'amorces utilisés sont présentées dans le tableau en annexe p 251.

3. Complémentation des mutants *qrt1xsia2-2+/-* de façon pollen-spécifique

a. Clonage de l'ADNc du gène *SIA2* dans le plasmide pBI101.3

La méthode de clonage choisie pour ce projet est adaptée de la technique USERTM (Uracil-Specific Excision Reagent, New England Biolabs, Nour-Eldin *et al.*, 2006 ; 2010). Un vecteur de transformation a été construit à partir du plasmide pBI101.3 (ABRC, stock number CD3-387, Jefferson, 1987). Tout d'abord, la séquence du gène codant la β -glucuronidase (gène GUS) a été éliminée par la double digestion XmaI (SmaI) et SacI. Puis le vecteur pBI101.3 et la séquence du promoteur PPE50 pollen spécifique (Louvvet *et al.*, 2006) ont été modifiés afin de permettre un clonage USERTM (**Fig. 38**) (clonages réalisés par Gaëlle Lucas, laboratoire GlycoMEV).

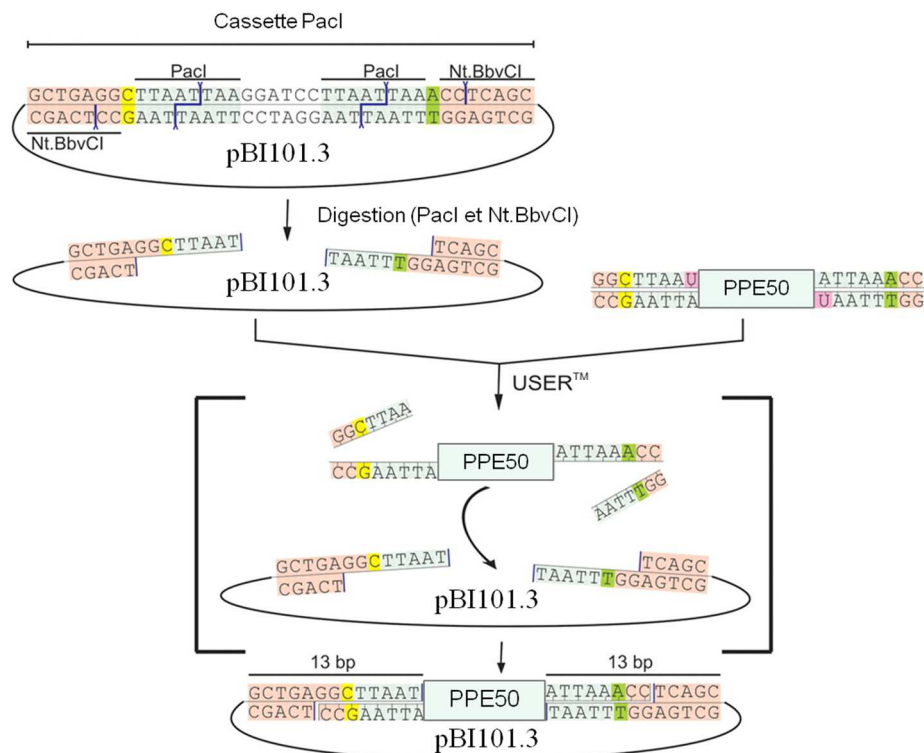


Figure 38 : Technique de clonage USER. Un vecteur pBI101.3 contenant une cassette PaclI est digéré avec les enzymes PaclI et Nt.BbvCI afin de générer des extrémités simple brin en 3' de 8 nucléotides. La séquence du promoteur PPE50 est amplifiée à l'aide de primers contenant des uraciles et l'enzyme PfuTurbo[®] Cx Hotstart DNA polymerase (Stratagene). Ce fragment PCR est incubé avec l'enzyme USERTM (qui retirent les bases uraciles représentées en rose, NEB Biolabs) et le vecteur linéarisé pendant 20 min à 37°C puis 20 min à 25°C. Le produit

hybridé est prêt à être transformé dans *E. coli*. Les sites de reconnaissance de Nt.BbvCI sont colorés en marron clair, les sites de PacI en bleu clair. Les bases azotées surlignées en jaune et vert au niveau des extrémités générées en 3' sont responsables de l'insertion orientée du fragment de PCR. D'après Nour-Eldin *et al.*, 2006.

Puis, l'ADNc du gène At3g48820 (U19220, *ABRC*) est préparé de façon similaire pour un clonage USER™ en 3' du promoteur PPE50. L'insert U19220 et le vecteur pBI101.3 sont incubés en rapport 40/1 (40 ng d'insert pour 100 ng de vecteur) en présence de l'enzyme USER™ pendant 20 min à 37°C puis 20 min à 25°C et conservés à 4°C jusqu'à la transformation. Un contrôle est préparé en parallèle dans les mêmes conditions en omettant l'insert dans le mélange. Le plasmide final est représenté dans la **Figure 39**.

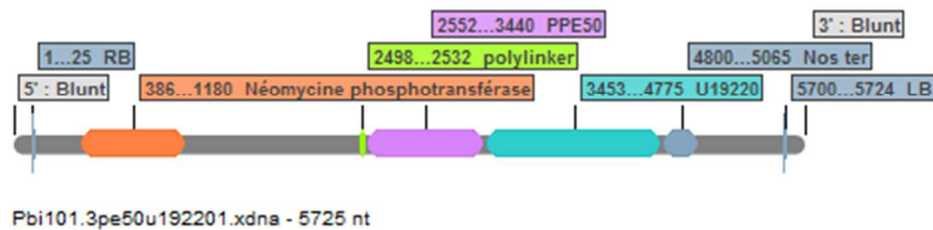


Figure 39 : Séquence de la région ADN-T du plasmide pBI101.3 utilisé pour la complémentation pollen-spécifique des mutants *qrt1x_{sia2}-2+/-*. Le gène codant la néomycine phosphotransférase confère à la souche la résistance à l'antibiotique kanamycine. Le promoteur PPE50 est représenté en violet et l'ADNc U19220 en bleu clair. Schéma réalisé à l'aide du logiciel SerialCloner 2.1 (http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner).

b. Mises en compétence et transformation bactérienne

-Transformation d'*E.coli* DH5α

L'ensemble de la transformation est réalisée en conditions stériles. 10 µL du mélange de clonage insert-vecteur sont transférés dans un tube eppendorf de 1.5 mL, maintenu dans la glace. 50 µL de cellules DH5α thermocompétentes (Invitrogen) sont ajoutés et l'ensemble est conservé 30 min dans la glace. Un choc thermique, créant des pores dans la membrane plasmique bactérienne pour l'entrée du plasmide, appliqué pendant 45 sec à 42°C (dans un bain-marie) et le tube est aussitôt placé dans la glace. 900 µL de milieu LB sont ajoutés au mélange et les tubes sont placés à 37°C pendant 1 h sous agitation (225 rpm). Les cellules sont ensuite centrifugées pendant 4 min à température ambiante. Le surnageant (700 µL) est éliminé et les cellules sont étalées sur milieu LB solide (supplémenté avec 25 µg.mL⁻¹ de kanamycine,

antibiotique de résistance présent dans l'insert). La culture est placée une nuit à 37°C. La transformation contrôle, préparée avec le vecteur vide, est réalisée dans les mêmes conditions. Les colonies sont criblées le lendemain par PCR afin de sélectionner les clones positifs et une préculture de chaque colonie est préparée en parallèle. Le plasmide est ensuite extrait par miniprep afin de vérifier la séquence de l'insert U19220, par séquençage (<http://www.gatc-biotech.com>), avant de procéder à l'étape suivante. Puis, afin de recueillir une quantité suffisante d'ADN plasmidique, une midiprep est réalisée à partir d'une culture de 100 mL des clones positifs.

-Digestions enzymatiques contrôles des produits PCR et des plasmides.

Les digestions sont réalisées à l'aide d'enzymes de restriction (New England Biolabs ou Promega) à raison de 5 U d'enzyme pour 1 µg d'ADN dans le tampon adapté pour chaque enzyme. En règle générale, la réaction s'effectue pendant 2 h dans un bain-marie réglé à 37°C.

-Transformation d'*A. tumefaciens* par choc thermique

Un aliquot d'*A. tumefaciens* (500 µL) est mis à décongeler lentement sur glace. Environ 10 µg de vecteur sont ajoutés puis le mélange est placé 5 min dans la glace, 5 min dans l'azote liquide et enfin 5 min à 37°C avant d'être replacé dans la glace. Un mL de milieu LB sans antibiotiques est ajouté et les agrobactéries sont mises en culture pendant 4 h à 28°C. La culture est ensuite centrifugée à 1 500 g pendant 2 min et 800 µL de surnageant sont éliminés. Le culot d'agrobactéries est repris dans les 200 µL restant et étalé sur un milieu LB solide contenant les antibiotiques spécifiques du plasmide et de l'insert [rifampycine (50 mg.L⁻¹), et kanamycine (25 mg.L⁻¹)]. La culture est placée dans une étuve à 28°C pendant 48 h.

c. Transformation stable d'*Arabidopsis qrt1xsia2-2+/-* par « floral dipping »

Une colonie transformée d'*A. tumefaciens* est mise en pré-culture dans 5 mL de milieu LB supplémenté avec les antibiotiques de sélection pendant une nuit à 28°C, sous agitation à 200 rpm. Cinq mL de la pré-culture bactérienne ayant atteint la phase stationnaire sont dilués dans 495 mL de milieu LB contenant les antibiotiques de sélection puis placés de 18 à 24 h à 28°C sous agitation (200 rpm). Les cellules sont centrifugées à 5 000 g pendant 20 min, à 4°C et le culot bactérien est resuspendu dans un bécher contenant le milieu d'infiltration composé de saccharose 5% (p/v) et de Silwet L-77 0,05% (v/v) de manière à avoir une densité optique (mesurée à 600 nm) de 0,8. Les plantes d'*Arabidopsis* sont transformées génétiquement par la méthode du « floral dipping » (Clough & Bent, 1998). Les plantes *qrt1xsia2-2+/-* au stade

hampe florale, dépourvues de siliques, sont mises en contact des bactéries en plongeant les bourgeons floraux pendant 10 min dans la solution d'agrobactéries puis placées dans une pochette plastique afin de conserver une forte humidité et favoriser la transformation. Les plantes sont laissées ainsi à l'horizontale et à l'obscurité pendant une nuit avant d'être replacées en chambre de culture.

d. Sélection des plantes transformées

Les graines issues de la deuxième génération des plantes transformées sont sélectionnées sur milieu LB sélectif (contenant de la kanamycine 35 mg.L⁻¹). Les plantes résistantes à l'antibiotique sont transférées en terre deux semaines après la germination et une vérification supplémentaire de la présence de l'ADN-T est effectuée par PCR.

3. Techniques d'histochimie

1. Coloration GUS

La coloration GUS permet de mettre en évidence l'activité du gène rapporteur de la β -glucuronidase.

Sur fleurs d'*Arabidopsis* : Les fleurs entières d'*Arabidopsis* sont fixées dans de l'acétone 80% (v/v), sur glace, pendant 30 min puis rincées deux fois avec du tampon de rinçage [2 mM ferrocyanure de potassium ; 2 mM ferricyanide de potassium ; 50 mM NaPO₄ pH 7 ; 0,2% Triton X100 (v/v)]. La coloration bleue apparaît après une incubation d'une nuit, à 37°C et à l'obscurité, dans le tampon de coloration GUS [tampon de rinçage supplémenté par 1 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronic acid (X-Gluc)]. Les fleurs sont décolorées par des bains successifs d'éthanol 70% et observées sous loupe binoculaire.

Sur une culture de pollen : Un volume d'acétone 80% est ajouté à la culture de pollen après 6 h de germination. Après 15 min, la culture est centrifugée à 7 000 g pour 7 min et rincée à deux reprises avec un volume de tampon de rinçage. La culture est resuspendue dans 1 mL de tampon de coloration et incubée une nuit, à 37°C et à l'obscurité. Les grains de pollen et les tubes polliniques n'ont pas été décolorés mais directement observés au microscope en lumière transmise.

2. Coloration à l'aniline bleue

La coloration des pistils d'*Arabidopsis* à l'aniline bleue permet de mettre en évidence les bouchons de callose des tubes polliniques, en croissance dans l'organe femelle. Les fleurs d'*Arabidopsis*, préalablement ou non colorées au GUS, sont réhydratées progressivement par des bains de 10 min d'éthanol à 70%, 50%, 30% puis par de l'eau distillée, à température ambiante. Les fleurs sont ensuite disséquées pour ne garder que le pistil puis chaque pistil est déposé sur le puits d'une lame de microscopie et traité une nuit avec 8 M NaOH, à température ambiante et dans une enceinte humide (100% d'humidité relative). Le NaOH est éliminé, les pistils sont rincés plusieurs fois à l'eau distillée et incubés 2 h à l'obscurité, dans une solution d'aniline bleue à 0,1% (p/v) décolorée (préparée la veille dans un tampon à 108 mM K₃PO₄, pH 11) (Johnson-Brousseau & McCormick, 2004). L'observation s'effectue sous lumière ultraviolette (UV) au microscope à épifluorescence (excitation entre 320-390 nm, filtre d'émission à 461 nm).

3. Coloration des racines au calcofluor

Afin de mettre en évidence les β -glucanes, les racines d'*Arabidopsis* sont incubées 5 min avec 0,001% de calcofluor (p/v) (Sigma) dans un milieu MS liquide contenant 1% de saccharose. L'observation des racines est effectuée au microscope confocal (Zeiss Observer.Z1) sous fluorescence UV (filtre d'excitation 359 nm ; filtre d'émission 461 nm).

4. Immunomarquage sur tubes polliniques

Pour l'immunomarquage des tubes polliniques, une culture de tubes polliniques fixés après 6 h, et conservée à 4°C un mois maximum, est transférée, sous hotte, sur une colonne de purification d'ADN (NucleoSpin® Plasmid Binding Columns, Macherey-Nagel, catalog number 740588.50). Le milieu de fixation est éliminé par centrifugation à 300 g pendant 1 min. Trois lavages sont effectués au tampon phosphate salin 1X (PBS) (137 mM NaCl ; 2,7 mM KCl ; 7 mM Na₂HPO₄ 7H₂O ; 1,5 mM KH₂PO₄) en gardant les mêmes paramètres de centrifugation. Puis une incubation de 30 min dans du PBS 1X-lait 3% (p/v) permet de saturer en protéines les sites non spécifiques. Après trois lavages au PBS 1X, les tubes polliniques sont incubés une nuit à 4°C dans un anticorps primaire dilué au 1 : 20 (pour l'anti-RG-II) dans du PBS 1X. Les tubes polliniques sont rincés à trois reprises au PBS 1X puis incubés 2 h à 30°C,

à l'obscurité, avec un anticorps secondaire couplé à la fluorescéine isothiocyanate (FITC) (produit chez la chèvre et dirigé contre les anticorps produits chez le lapin pour l'anti-RG-II) dilué au 1 : 50 dans du PBS 1X. Des lavages au PBS 1X (cinq minimum) permettent d'éliminer totalement l'anticorps secondaire non fixé aux épitopes. Les tubes polliniques sont remis en suspension dans 100 µL d'eau distillée (la colonne peut être légèrement vortexée si les tubes restent accrochés à la membrane de la colonne) et placés entre lame et lamelles. Un échantillon contrôle est préparé en parallèle en omettant l'anticorps primaire.

Notes : Pour éviter d'endommager les tubes polliniques, chaque étape de transfert et de lavage se fait avec un cône dont l'extrémité a été préalablement coupée.

Lors des différentes étapes d'incubation, le haut et le bas de la colonne sont fermés à l'aide de parafilm®.

Observation : Les immunomarquages sur tubes polliniques sont observés au microscope inversé Leica DMI6000B équipé d'une caméra DFC450 C et d'un filtre FITC (filtre d'excitation 485–520 nm ; filtre d'émission, 520–560 nm).

Cette technique d'immunomarquage sur tubes polliniques d'*Arabidopsis* a fait l'objet d'une publication dans le journal Bio-Protocol présenté en annexe p 252.

5. Click chemistry

a. *Arabidopsis thaliana*

-Incorporation d'un sucre modifié

Des plantules d'*Arabidopsis* de 4 jours cultivées sur milieu MS solide + 1% saccharose (p/v) sont transférées dans un puits d'une plaque 12 puits contenant 1 mL de milieu MS liquide supplémenté avec un monosaccharide modifié [2,5 µM de Fuc-Al (Invitrogen) ou 50 µM de Kdo-N₃ fourni par l'institut de chimie des substances naturelles (ICSN)]. Des inhibiteurs potentiels de l'incorporation peuvent être ajoutés au milieu. Cinq à vingt plantules peuvent être placées dans le même puits sans observer une diminution de l'incorporation. La plaque est placée une nuit en chambre de culture [photopériode de 16 h jour (120 µE.m⁻².s⁻¹), /8 h nuit], à 22°C.

-Réaction de click chemistry

Les plantules sont rincées trois fois avec 1 mL de MS liquide avant d'être incubées dans 1 mL de solution de marquage contenant le fluorochrome compatible avec le monosaccharide incorporé et les catalyseurs [0,1 μ M Alexa Fluor[®] 488 azide ou 0,1 μ M Alexa Fluor[®] 488 alkyne (Invitrogen) ; 1 mM CuSO₄ ; 1 mM acide ascorbique]. La réaction de click a lieu à l'obscurité pendant 1 h, à température ambiante et sous agitation. Les plantules sont rincées une première fois au MS liquide, incubées 5 min dans du MS liquide contenant 0,01% (v/v) de Tween 20, puis lavées quatre fois au MS liquide. Un dernier rinçage est effectué dans de l'eau distillée. Un puits contrôle est préparé en parallèle en omettant le monosaccharide modifié lors de l'étape d'incorporation, ou le fluorochrome.

En ce qui concerne le double marquage Fuc-Al et Kdo-N₃, les plantules sont incubées 16 h dans 1 mL de MS liquide contenant 50 μ M de Fuc-Al et 50 μ M de Kdo-N₃. Après trois rinçages au MS liquide, les plantules sont incubées 1 h, à l'obscurité, dans une première solution de marquage [1 mL de MS liquide contenant 0,1 μ M Alexa Fluor[®] 594 Azide (Life Technologies) ; 1 mM CuSO₄ ; 1 mM ascorbic acid], rincées une fois au MS liquide et incubées dans la deuxième solution de marquage [1 mL de MS liquide contenant 0,1 μ M Alexa Fluor[®] 488 alkyne (Life Technologies) ; 1 mM CuSO₄ ; 1 mM ascorbic acid] pendant 1 h, à l'obscurité. Les plantules sont ensuite rincées comme décrit précédemment.

b. Cellules BY-2

-Incorporation d'un sucre modifié

Dans un tube de 2 mL, le Kdo-N₃ est dilué à 200 μ M dans 500 μ L de milieu MS liquide. Un volume de cellules BY-2 âgées de 3 jours (correspondant à une phase de croissance) est ajouté. Les cellules sont ainsi incubées dans une solution de Kdo-N₃ à 100 μ M pendant 16 h, à l'obscurité, sur une table agitante (100 rpm), à température ambiante.

-Réaction de click chemistry

Les cellules sont rincées trois fois au MS liquide, par centrifugation de 2 min à 700 g. Le culot cellulaire est ensuite resuspendu dans 500 μ L de solution de marquage [0,1 μ M Alexa Fluor[®] 488 alkyne (Invitrogen) ; 1 mM CuSO₄ ; 1 mM acide ascorbique]. Les tubes sont placés sur une table agitante (100 rpm) pendant 1 h, à l'obscurité et à température ambiante. Après élimination du surnageant, les cellules BY-2 sont rincées une première fois avec un volume de MS liquide, puis incubées 5 min dans un volume de MS liquide supplémenté avec 0,01% (v/v)

de Tween 20. Trois rinçages supplémentaires au MS liquide simple, et un dernier à l'eau bi-distillée, sont effectués pendant 5 min chacun.

Les observations sont effectuées à l'aide d'un microscope confocal (TCS SP2 AOBS, Leica) équipé de lasers d'excitation à 488 nm (filtre d'émission 495-550 nm) et à 594 nm (filtre d'émission 610-670 nm). Les observations de double marquage sont effectuées en mode séquentiel.

c. Pulse Chase

Afin d'observer la dynamique du RG-II à l'échelle cellulaire par la méthode du pulse chase, l'incorporation du Kdo-N₃ s'effectue pendant un temps plus court (4 h) et en concentration plus élevée (200 µM de Kdo-N₃), c'est l'étape de « pulse ». Après incorporation, l'étape dite de « chase » consiste à transférer les plantules d'*Arabidopsis* sur un milieu MS solide + 1% saccharose (p/v) dépourvu de Kdo-N₃. A des temps définis, quelques plantules sont placées dans la solution de marquage pendant 1 h, rincées et observées directement au microscope confocal. Ainsi, il est possible de suivre l'évolution du marquage au cours du temps.

6. Fixation mécanique d'*Arabidopsis* et enrésinement au méthacrylate

-Fixation mécanique des racines

Cette technique a été adaptée à partir du protocole paru dans Wu *et al.* (2012). Le principe consiste à créer un support permettant de maintenir la racine de plantules d'*Arabidopsis* rectiligne pendant les étapes d'enrésinement (**Fig. 40**). Des boucles de fil de fer fin sont formées (**Fig. 40a**) et aplaties entre deux plaques de fer ou grâce à un étau. Une lame de microscopie en verre dégraissée, est plongée dans une solution à 1,1% de Formvar[®] (p/v) dilué dans du chloroforme (**Fig. 40b**) ; elle est ensuite séchée verticalement quelques minutes. Des rectangles sont dessinés à l'aide d'une lame de rasoir sur la surface de la lame (**Fig. 40c**) puis la lame est délicatement plongée à 45 ° dans un récipient rempli d'eau (**Fig. 40d**). Les rectangles se détachent au contact de l'eau. Une boucle de fer est alors plongée à la verticale au milieu d'un rectangle de Formvar[®] (**Fig. 40e**). L'ensemble sèche pendant 24 h à température ambiante. Une racine d'*Arabidopsis* fixée 2 h dans un tampon de fixation [50 mM tampon PIPES pH 6,9 ; 1 mM CaCl₂ ; 4% paraformaldéhyde (v/v)] et rincée deux fois 10 min dans le même tampon, sans paraformaldéhyde, est allongée sur une boucle. La partie dépassant de la boucle est coupée (**Fig. 40f**) et la boucle est de nouveau plongée dans un rectangle de Formvar[®] (**Fig. 40g**). L'ensemble

formar/racine/formvar sèche 15 min à la verticale. La racine ainsi fixée mécaniquement, est placée dans un tube Eppendorf pour procéder aux bains de déshydratation.

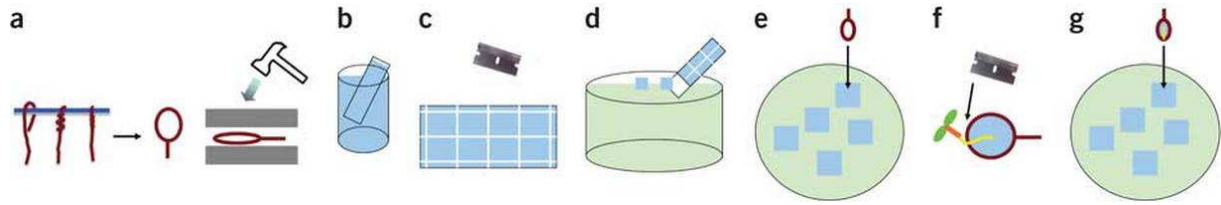


Figure 40 : Schéma représentant les différentes étapes de création des boucles recouvertes de Formvar®. D'après Wu *et al.*, 2012.

Des bains d'EtOH à 10%, 30%, 50%, 75%, 90%, de 45 min chacun sont effectués sous agitation rotative douce (20 rpm maximum), à température ambiante. Pour finaliser la déshydratation, la racine est placée toute la nuit dans un bain d'EtOH absolu, sous agitation (20 rpm maximum).

-Préparation du méthacrylate

Sous hotte, 77 mg d' α -dithiothréitol sont ajoutés à un mélange composé de 40 mL de butylméthacrylate et de 10 mL de méthylméthacrylate (4/1) (v/v) (Sigma). Le mélange est homogénéisé et laissé dégazer sous hotte pendant 30 min. Puis, 250 mg d'éthyl éther de benzoïne (Sigma) sont ajoutés au mélange en évitant de former des bulles. Une partie de cette solution de méthacrylate est diluée à 25%, 50%, 75% dans de l'EtOH absolu.

-Enrésinement

Le bain d'EtOH absolu est remplacé par du méthacrylate à 25% et l'échantillon est incubé pendant 3 h sous agitation rotative (20 rpm). Puis la solution est échangée par du méthacrylate à 50% pour la nuit. La solution est ensuite changée par une solution de méthacrylate à 75% pendant 3 h puis par la solution de méthacrylate pure pendant une nuit. Une nouvelle incubation des racines dans du méthacrylate 100% est effectuée pendant 3 h. Des moules cylindriques sont remplies à $\frac{1}{4}$ avec la solution pure de méthacrylate, sans former de bulles, et les échantillons sont placés au fond du moule (la racine est parallèle au fond du moule). Les moules sont remplis complètement avec la solution de méthacrylate pure, fermés, puis placés à 4°C sous lumière UV, jusqu'à polymérisation complète du méthacrylate (48 h en moyenne). Les blocs de résine sont ensuite démoulés, taillés en pyramide, et des coupes longitudinales semi-fines (de 0,5 μ M d'épaisseur) de la racine sont effectuées au microtome UCT (Leica).

Dans le cas de coupes transversales, les blocs sont réorientés. Après démoulage, un tronçon de 0,5 cm d'épaisseur englobant la racine est taillé dans le bloc. Le tronçon est placé dans un moule (préalablement rempli à $\frac{1}{4}$ avec la solution pure de méthacrylate) de manière à avoir la racine en position transversale. Le moule est rempli de méthacrylate et remplacé sous UV pour la polymérisation.

4. Techniques de biochimie

1. Extraction pariétale

-Obtention de la paroi brute

Les tissus végétaux sont immergés dans de l'EtOH à 70% et chauffés 15 min à 70°C au bain-marie. L'échantillon est homogénéisé à l'aide d'un potter et centrifugé (5 min, 4 000 g, 4°C) pour éliminer le surnageant. Le culot est repris dans de l'EtOH à 70% et de nouveau chauffé 15 min à 70°C au bain-marie. Ces étapes de traitement à l'EtOH chaud sont répétées jusqu'à ce que le surnageant soit clair, signe que les pigments chlorophylliens ont été principalement éliminés. Une étape supplémentaire de traitement par un mélange méthanol/chloroforme (v/v), une nuit sous agitation, peut être ajoutée. La fraction ainsi obtenue est constituée de la paroi brute appelée résidu insoluble à l'alcool (AIR = Alcohol Insoluble Residue).

-Extraction à l'eau chaude des pectines

Les tubes polliniques de 6 h issus de cultures d'environ 3 600 fleurs d'*Arabidopsis* et fixés dans 3 volumes d'EtOH 95% sont transférés dans un Falcon de 50 mL. Le surnageant est éliminé et le culot de tubes polliniques est rincé par de l'EtOH 70% afin de purifier l'échantillon des sels et du saccharose provenant du milieu de germination du pollen. Le tube est chauffé 15 min à 70°C dans un bain-marie puis l'échantillon est broyé manuellement au potter. Après une centrifugation de 5 min à 4 700 g, la fraction éthanolique est écartée et le culot est séché sous hotte. Le culot est repris dans 5 mL d'eau distillée et placé au bain-marie à 90°C pendant 1 h afin de solubiliser les pectines. Après centrifugation, la fraction obtenue, enrichie en pectines, est lyophilisée.

2. Analyse des monosaccharides par chromatographie en phase gazeuse (GC)

a. Préparation des échantillons

Les extraits pariétaux sont transférés dans des flacons adaptés au passeur automatique d'échantillons. La première étape consiste à hydrolyser les échantillons par traitement à l'acide trifluoroacétique (TFA) 2 M pendant 2 h à 110°C. Le TFA est évaporé sous un flux d'air et 50 µL d'une solution d'inositol 2 mM, servant de témoin interne, sont ajoutés dans chaque échantillon, et évaporé. Puis 500 µL de méthanol-HCl (Supelco) sont ajoutés et les flacons sont placés 16 h dans une étuve à 80°C afin de convertir les monosaccharides en méthyl-glycosides. Après évaporation du méthanol-HCl, deux lavages au méthanol sont réalisés afin d'éliminer toute trace d'acide. Les méthyl-glycosides sont ensuite convertis en leur dérivés triméthyl-silyl, volatils, par ajout de 200 µL de réactif de silylation (hexaméthylidisilane / triméthylchlorosilane / pyridine, 3:1:9, Supelco) suivi d'une incubation de 20 min à 110°C. Le réactif est évaporé sous flux d'air et deux rinçages au cyclohexane sont réalisés. Les échantillons sont repris dans 1 mL de cyclohexane (pour des faibles quantités de paroi, l'échantillon est repris dans 100 µL et placé dans un insert adapté au flacon).

b. Analyse

Pour l'analyse par chromatographie en phase gazeuse, 1 µL de l'échantillon est prélevé par le passeur d'échantillon (équipé d'une seringue Hamilton de 10 µL). L'appareil de chromatographie en phase gazeuse est de type Varian 3800 et est équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID). Chaque monosaccharide possède un temps de rétention spécifique attribué par comparaison au temps de rétention des monosaccharides contenus dans un échantillon standard (constitués de rhamnose, galactose, fucose, xylose, arabinose, mannose, glucose, acide galacturonique, acide glucuronique en concentration à 0,1 nmol.µL⁻¹) préparé en parallèle. L'aire obtenue pour chaque monosaccharide est intégrée (intégreteur STAR Workstation Varian 5.52) et quantifiée par rapport au standard interne, l'inositol. Les résultats sont exprimés en pourcentage relatif par rapport à l'ensemble des monosaccharides présents.

La séparation des monosaccharides de l'extrait pectique à l'eau chaude des tubes polliniques d'*Arabidopsis* est effectuée par GC (HP6890 series) sur une colonne capillaire Zebron Z5-MSi (longueur 30 m, diamètre 0.25 mm) (Macherey–Nagel). L'analyse se fait par couplage à un spectromètre de masse à impact électronique (pour l'ionisation de l'échantillon)

grâce à un système de couplage Autospec GC–EIMS (Micromass) équipé d’un système Opus 3.1 data. Cette technique d’analyse de la composition en sucres d’un extrait pariétal de tubes polliniques d’*Arabidopsis* à l’eau chaude a fait l’objet d’une publication dans le journal Bio-Protocol présenté en annexe p 259.

3. Analyse du XyG par spectrométrie de masse MALDI-TOF

a. Extraction des xyloglucanes

L’AIR des parties aériennes et des parties racinaires séparées de 200 à 500 plantules d’*Arabidopsis* âgées de 10 jours est préparé comme décrit précédemment sans étape de traitement au méthanol /chloroforme. Un rinçage de l’AIR est effectué à l’eau et le culot est séché. Les fragments de XyG sont produits en traitant l’AIR avec 4 unités d’endo-(1→4)-β-glucanase (EC 3.2.1.4 ; Megazyme) dans 100 μL de tampon acétate de sodium, pH 5, pendant une nuit à 37°C et sous agitation (180 rpm). L’échantillon est centrifugé 10 min à 10 000 g afin de culoter la paroi non digérée.

b. Analyse par MALDI-TOF

Un μL du surnageant est soit directement déposé sur une plaque métallique, appelée cible, soit dilué au 1/10 dans une solution de TFA 0,1%. A chaque dépôt est ajouté 1 μL de matrice, l’acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB) préparée le jour même à 5 mg.mL⁻¹ dans un mélange acétonitrile/TFA 0,1%, (70/30) (v/v). Après dépôts sur la cible, le mélange échantillon-matrice est homogénéisé par pipettage.

L’acquisition des spectres a été effectuée sur un spectromètre de masse à temps de vol Voyager DE-Pro (Ab Sciex) équipé d’un laser à azote de longueur d’onde 337 nm. Les paramètres du spectromètre de masse et les traitements de données sont respectivement réalisés par les logiciels Data Voyager™ et Data Explorer™ 4.0 Software. Le spectromètre est équipé d’un laser à azote de longueur d’onde 337 nm. La pression au niveau de la source est de 10⁻⁷ Torr et celle de l’analyseur est de 10⁻⁸ Torr. Le temps d’impact du laser est de 3 ns. Tous les spectres ont été obtenus en mode d’ionisation positif et en mode réflectron. Les ions sont accélérés sous une tension d’accélération de 20 kV. Chaque acquisition est une moyenne de 3000 tirs lasers et le spectre final est la moyenne de 3 à 5 acquisitions. Les spectres ont été calibrés de façon externe avec des calibrants commerciaux (ProteoMass™ Peptide MALDI-MS Calibration kit, Sigma-Aldrich).

4. Analyse des N-glycannes

a. Extraction de protéines totales.

Les protéines sont extraites à partir de 200 à 800 plantules d'*Arabidopsis* cultivées 10 jours sur milieu Arabidopsis. Les parties racinaires sont transférées dans un Eppendorf contenant 1 mL de tampon 0,1 M Tris pH 8 contenant 0,1% de SDS puis broyées sur glace, à l'aide d'un micro-pilon. L'extrait est lyophilisé puis repris dans 600 µL du tampon utilisé pour l'extraction.

b. SDS-PAGE

Les extraits protéiques sont séparés par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide contenant du laurylsulfate de sodium (SDS-PAGE) à 12%. Un premier gel de séparation est préparé [2,15 mL H₂O ; 1,50 mL 40% acrylamide/Bis acryl (29/1) (v/v) ; 1,25 mL 1,5 M Tris pH 8,8 ; 0,05 mL 10% SDS ; 0,05 mL 10% APS ; 0,002 mL TEMED], coulé entre deux plaques de verre et laissé polymérisé pendant 20 min. Puis un gel de concentration (1,8 mL H₂O ; 0,40 mL 40% acrylamide/Bis acryl (29/1) (v/v) ; 0,6 mL 1.5M Tris pH 6,8 ; 0,025 mL SDS 10% ; 0,025 mL APS 10% ; 0,001 mL TEMED), est ajouté au-dessus, un peigne permettant de former les puits et inséré entre les deux plaques. Pendant le temps de polymérisation du gel, 20 µL des extraits protéiques sont dénaturés 5 min à 100°C en présence d'1/5 de tampon de charge (62,5 mM TrisHCl pH 6,8 ; 2% SDS ; 2,5% β-mercaptoéthanol ; 10% glycérol ; 0,005% bleu de bromophénol). Les échantillons sont chargés dans les puits du gel ainsi qu'un marqueur de poids moléculaire (BP3603, Thermo Fisher Scientific). La migration s'effectue à 180 V (voltage constant) jusqu'à ce que la ligne de front (couleur bleue) atteigne le bas du gel.

c. Transfert sur membrane de nitrocellulose et western blot

Après séparation par SDS-PAGE, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose pendant 45 min à 15 V (voltage constant) en milieu tamponné (125 mM TrisBase pH 8, 960 mM glycine, 0,5% SDS, 10% EtOH). La présence des protéines sur la membrane est évaluée par coloration au rouge Ponceau (0,2% Ponceau S ; 3% TCA) puis la membrane est rincée à l'eau.

La membrane est saturée une nuit sous agitation, dans un tampon tris salin 1X (50 mM Tris pH 7,5 ; 150 mM NaCl) (TBS) supplémenté avec 0,1% de Tween-20 (TBST). La membrane est ensuite incubée dans l'anticorps primaire dilué au 1/10 000 dans du TBST, pendant 2 h à température ambiante, sous agitation. Après trois lavages de 10 min dans du TBST, la

membrane est incubée 2 h dans l'anticorps secondaire (IgG anti-lapin produit chez la chèvre) couplé à la phosphatase alcaline dilué au 1/1 000 dans du TBST. La membrane est lavée six fois 10 min au TBST puis trois fois 5 min dans du TBS. Le substrat de la phosphatase alcaline (Western Blue[®] Stabilized substrate for alkaline phosphatase, Promega) est appliqué sur la membrane jusqu'à ce que la coloration apparaisse) puis rincée à l'eau distillée afin de stopper la réaction.

5. Analyse du RG-II par électrophorèse

a. Extraction du RG-II

Des racines de 200 à 1000 plantules *d'Arabidopsis* âgées de 10 jours sont broyées au micro-pilon dans un Eppendorf contenant 1 mL d'EtOH à 70%. Le broyat est centrifugé 10 min à 14 000 g et le culot est lavé à l'EtOH à 70% jusqu'à ce que le surnageant soit clair. Un lavage supplémentaire est effectué à l'acétone 100%. L'AIR obtenu est séché et saponifié par 1 M de Na₂CO₃ à 4°C sous agitation pendant une nuit afin de déméthylestérifier les homogalacturonanes. Le culot est lavé à l'eau distillée jusqu'à ce que le pH soit neutre puis traité avec 5 U d'endo-polygalacturonase (5000 U.mL⁻¹, Megazyme) dans 500 µL d'un tampon acétate d'ammonium (0,05 M, pH 4,8) pendant 16 h à 37°C, sous agitation (180 rpm). La partie soluble enrichie en RG-II est lyophilisée puis reprise dans 25 µL de tampon acétate d'ammonium.

b. Electrophorèse de RG-II

La méthode d'électrophorèse appliquée au RG-II a été adaptée à partir du protocole décrit par Chormova *et al.* (2014a et b). Un gel de séparation à 26% de polyacrylamide est préparé puis un gel de concentration à 10% de polyacrylamide est ajouté au-dessus. 8 µL des extraits de RG-II sont mélangés à 2 µL de tampon de charge (0,63 M Tris-HCl contenant 0,25% (p/v) de bleu de bromophénol ; 50% (v/v) glycérol ; pH 8,8) et chargé dans un puits du gel. Quarante-vingt µg de RG-II de citron (fourni par Marie-Christine Ralet, INRA de Nantes) sont chargés en parallèle. Afin de repérer où se situe le monomère de RG-II, 80 µg de RG-II de citron est incubé 16 h dans 0,1 M de HCl (v/v) à température ambiante, et l'acidité de l'échantillon est neutralisé par ajout de 0,1 M de NaOH (v/v) avant la migration. L'électrophorèse s'effectue à 220 V pendant 130 min. Le gel est ensuite fixé dans 30 mL d'EtOH/acide acétique/H₂O (4/1/5) (v/v/v) pendant 30 min.

c. Coloration au nitrate d'argent

Pour la coloration au nitrate d'argent, toutes les solutions doivent être préparées à partir d'eau bi-distillée. Le gel fixé est rincé trois fois à l'EtOH 30% et trois fois à l'eau bi-distillée pendant 10 min. Le gel est ensuite sensibilisé 1 min dans une solution à 0,01% de thiosulfate de sodium et rincé trois fois à l'eau bi-distillée avant d'être incubé 20 min dans la solution de nitrate d'argent à 0,1% contenant 0,075% de formaldéhyde (cette solution doit être préparée extemporanément pendant 20 min à l'obscurité. Le gel est rincé trois fois à l'eau bi-distillée. La coloration apparaît par incubation du gel dans la solution de développement (3% Na₂CO₃ ; 2 mg.L⁻¹ de thiosulfate de sodium ; 0,5% formaldéhyde). Dès que les bandes apparaissent, le gel est transféré dans une solution d'acide acétique à 2% (v/v) et 4% de Tris (p/v) permettant de stopper la réaction pendant 10 min. Le gel est conservé dans l'eau.

6. Peracétylation/Dé-acétylation

-Peracétylation

Cinq mg des désoxy-fluoro-glucoses sont peracétylés dans 150 µL d'un mélange pyridine/anhydride acide (2/1) pendant une nuit à 20°C. L'excès de réactif est évaporé avec du toluène sous un flux d'air.

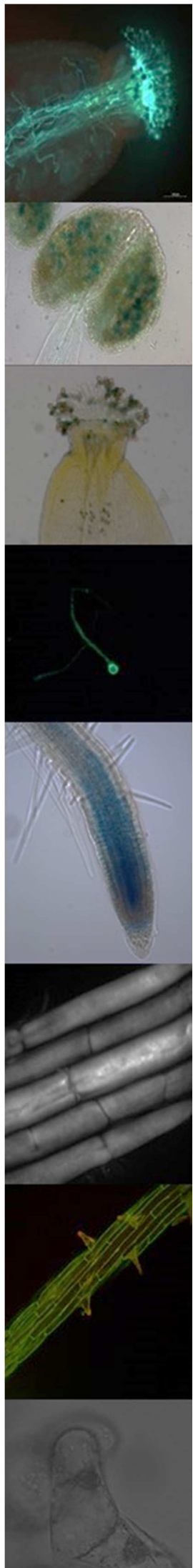
-Dé-acétylation

Le Ac2F-Fuc et le Ac3F-NeuAc sont dé-acétylés dans 0,1 M de NaOH pendant une nuit à 4°C puis le pH est neutralisé par 0,1 M d'acide acétique.

5. Analyses d'image et statistiques

Les images des pistils d'*Arabidopsis* ont été assemblées à l'aide du logiciel GIMP (GNU Image Manipulation Program) (<http://www.gimp.org/>).

L'ensemble des données ont été analysées statistiquement grâce au programme GraphPad Prim[®] (www.graphpad.com). Les différences ont été considérées significatives dès lors que la p-value du test choisi était inférieure à 0,05.



IV-CONCLUSION

ET

PERSPECTIVES

L'objectif principal de ce travail de thèse était d'approfondir la compréhension du rôle biologique du RG-II lors de l'élongation cellulaire et ceci en caractérisant sa biosynthèse par une approche de génétique fonctionnelle et en mettant au œuvre des approches innovantes basées sur l'emploi de nouveaux outils pharmacologiques et de nouvelles méthodes de suivi de molécules glycosidiques de surface (« click chemistry »).

1. Vers une identification des glycosyltransférases spécifiques de la voie de biosynthèse du RG-II

Cette première partie a été initiée à partir de l'analyse bioinformatique décrite par Voxeur *et al.* (2012) qui a permis de sélectionner 26 gènes candidats chez *Arabidopsis* codant des GTs potentiellement impliquées dans la biosynthèse du RG-II. Parmi ces séquences, une GT29 (*SIA2*) déjà pressentie pour coder une Kdo et/ou Dha transférase a fait l'objet d'une étude par génétique fonctionnelle. Aucun mutant homozygote n'a pu être obtenu ce qui nous a amenés à étudier le phénotype du pollen, cellule haploïde. Les résultats ainsi obtenus associés à ceux observés par Deng *et al.* (2010) sur la deuxième GT29 (*SIA1*), convergent pour attribuer un rôle essentiel de ces gènes dans l'élongation cellulaire. Pour confirmer que les défauts de croissance observés sont véritablement dus à la mutation du gène *sia2*, une complémentation pollen-spécifique des mutants a été entreprise en introduisant un vecteur contenant la séquence ADNc du gène *SIA2* sous contrôle d'un promoteur spécifique du pollen. Cette technique précédemment appliquée par Liu *et al.* (2011) avait permis d'obtenir des mutants *mgp4* homozygotes (n'exprimant pas la xylosyltransférase spécifique du RG-II) qui présentaient de sévères défauts de croissance racinaire. Une transformation stable des plantes *qrt1xsia2-2+/-* a été accomplie avec succès puis la germination du pollen issu de ces plantes a été évaluée. Une légère augmentation du taux de croissance a été observée mais demeure trop faible pour affirmer que le phénotype est restauré par la complémentation. Nous ne pouvons écarter l'hypothèse que la séquence introduite n'est pas exprimée correctement. Nous pourrions envisager l'alternative de générer des plantes mutées sur les gènes *sia1* et *sia2* par ARNi, qui permettrait d'inhiber partiellement l'expression de ces gènes et d'analyser un phénotype intermédiaire au niveau des parties végétatives comme il a été fait pour les mutants *gme* (Gilbert *et al.*, 2009 ; Voxeur *et al.*, 2011). Un autre système innovant d'origine procaryote découvert en 2012 (Jinek *et al.*, 2012), nommé CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*)/Cas, permet également de réprimer stablement l'expression de gènes avec une efficacité comparable à celle de la méthode du ARNi. Cette technique minimiserait un effet

non spécifique sur des gènes non-cibles et permettrait d'obtenir un taux de plantes transformées plus important (jusqu'à 89% chez *Arabidopsis*) (Belhaj *et al.*, 2013 ; Ma *et al.*, 2015). De plus, cette approche présente l'avantage de pouvoir modifier plusieurs gènes appartenant à une famille multigénique, différents gènes intervenant dans une même voie métabolique ou de créer plusieurs mutations en des sites différents d'un même gène, avec un faible risque de mutations.

En complément, il serait nécessaire de réaliser une caractérisation fonctionnelle des protéines SIA1 et SIA2 en mettant en place une méthode d'analyse de l'activité Dha/Kdo transférases *in vitro*, en les exprimant dans un système hétérologue, tels que la levure *Pichia pastoris* ou des cellules d'insectes, et d'effectuer des tests biochimiques de transfert de Kdo sur un squelette homogalacturonane en présence de CMP-Kdo généré *in situ*. Ce qui reste néanmoins délicat à mettre en place du fait de la courte demi-vie du CMP-Kdo.

2. Vers une localisation précise et dynamique du RG-II.

Comme il a été précédemment décrit, le tube pollinique constitue un modèle stratégique pour étudier l'impact d'une mutation, létale à l'état homozygote, sur l'élongation cellulaire. Plusieurs études portant sur des mutants altérés dans la structure du RG-II ont eu recours à ce modèle (Delmas *et al.*, 2008 ; Deng *et al.*, 2010 ; Liu *et al.*, 2011). Cependant, la présence et la distribution de ce polysaccharide pectique le long du tube pollinique n'a pas été décrite précisément. Notre étude de localisation immunocytochimique du RG-II grâce à un anticorps spécifique (Matoh *et al.*, 1998) nous a permis de détecter le RG-II uniformément le long du tube pollinique chez plusieurs espèces végétales (*Arabidopsis*, *Nicotiana benthamiana* et *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* WVA 106). Sa présence dans la paroi du tube pollinique a été confirmée par une analyse en GC-EIMS d'un extrait pariétale enrichi en pectine qui a révélé la présence de Kdo caractéristique du RG-II.

Bien que la spécificité de l'anticorps monoclonal préparé par Matoh *et al.* (1998) envers le RG-II soit admise, l'épitope spécifique auquel il se lie demeure inconnu. De nombreux essais de production d'anticorps anti-RG-II se sont révélés infructueux, probablement dû à la faible immunogénicité du RG-II. C'est pourquoi, nous avons décidé de mettre en œuvre une nouvelle approche de localisation du RG-II. Ainsi, nous avons testé la méthode dite de « click chemistry », développée depuis peu chez les plantes (Anderson *et al.*, 2012) et ceci à la fois sur des racines d'*Arabidopsis* et des cellules de tabac en culture (BY-2). Par cette approche, nous avons pu montrer que le Kdo-N₃, analogue structural du Kdo fourni par le Dr. Boris Vauzeilles

de l'ICSN de Gif sur Yvette, pouvait être métabolisé par une cellule végétale et incorporé dans le RG-II. L'utilisation de cet analogue de monosaccharide offre l'avantage de marquer uniquement les polysaccharides synthétisés au cours de la période d'incorporation. Les sondes classiques, telles que les anticorps, détectent quant à elles, tous les polysaccharides présents à un moment donné. Ainsi, il a été possible de suivre au cours de l'élongation cellulaire, la progression du monosaccharide, et *a fortiori* du RG-II, par technique de « pulse chase ». Après un « pulse » de 4 h, une incorporation homogène du Kdo-N₃ dans la paroi des cellules en élongation a été observée. Pendant la période de « chase » de 22 h, suffisant pour la croissance des cellules, ce marquage a été dilué révélant une orientation longitudinale du RG-II par rapport à l'axe d'élongation des cellules.

Comme évoqué dans la partie introductive, les sondes fluorescentes de type cyclooctyne permettent de s'affranchir du cuivre dans la réaction de « click chemistry » réalisée avec des sucres-azido. Ces sondes sont donc compatibles avec une approche *in vivo*. Dès lors, en utilisant les cellules BY-2, il serait envisageable de suivre le trafic du RG-II au cours de la croissance, cette fois en temps réel, comme il a été réalisé sur différentes bactéries par Kuru *et al.* (2012) avec des acides aminés modifiés, grâce à une approche microscopique en *time-lapse*. Généralement couplées à des fluorochromes de type Alexa qui ne peuvent pénétrer les membranes biologiques, la limite des sondes cyclooctynes est qu'elles ne permettent qu'un marquage de surface. D'autres sondes dérivées du naphthalamide ou de la coumarine (Sawa *et al.*, 2006 ; Hsu *et al.*, 2007), peuvent alors être utilisées en complément pour suivre le trafic intracellulaire du polysaccharide, des vésicules golgiennes jusqu'à son transport vers l'apoplasme.

La « click chemistry » constitue également un outil permettant d'affiner la caractérisation de l'incorporation sélective d'un analogue de sucre. En changeant la position du groupement azide, il est possible de vérifier si le transfert du sucre est toujours efficace et d'obtenir un aperçu de la spécificité des GTs. Dans le même esprit, ce type de réaction est utile dans une approche de criblage de mutants de GTs ou de mutants affectés dans l'activation du monosaccharide avant son transfert.

3. Altération de la structure du RG-II : approche pharmacologique

L'approche pharmacologique entreprise avec les analogues fluorés a montré que le remplacement d'un groupement hydroxyl par un atome de fluor dans la structure de glucides pouvait être un outil puissant pour perturber le métabolisme de la plante. Ainsi, le 2F-Fuc est capable d'inhiber plusieurs fucosyltransférases *via* son activation présumée sous forme GDP. Il en résulte un phénotype racinaire fortement altérée avec un défaut d'élongation cellulaire de la racine principale. La fucosylation du XyG et des *N*-glycannes est inhibée et la synthèse du RG-II fortement perturbée. Des études précédentes avaient montré que le résidu fucose du XyG et des *N*-glycannes n'était pas essentiel au développement de la plante en conditions normales de croissance (von Schaewen *et al.*, 1993; Vanzin *et al.*, 2002). En revanche, l'étude du mutant *mur1* (Reiter *et al.*, 1993 ; O'Neill *et al.*, 2001 ; Reuhs *et al.*, 2004) déficient en L-Fuc présente un phénotype nain au niveau des parties aériennes et un défaut de dimérisation du RG-II. L'analyse structurale du RG-II a révélé la substitution du L-Fuc par du L-Gal dans la structure du RG-II suggérant que la fucosyltransférase serait capable de transférer également du GDP-L-Gal. Cependant tel que décrit par Pabst *et al.* (2013), la substitution du résidu L-Fuc par du L-Gal ne serait pas responsable du phénotype, puisque ce changement est observé naturellement chez certaines dicotylédones (*Asplenium nidus*, *Solanum lycopersicum*, *Daucus carota*, *Valerianella locusta*) en proportion variable mais rarement chez les Brassicacées telles qu'*Arabidopsis*. Les auteurs en sont venus à conclure que le défaut de dimérisation du RG-II et le phénotype nain du mutant *mur1* serait ainsi dus à une chaîne A tronquée. Les enzymes responsables de la synthèse du RG-II auraient une affinité plus faible envers le L-Gal, par rapport au L-Fuc, ce qui ralentirait voire abolirait l'élongation de la chaîne A chez le mutant. Sur le profil électrophorétique du RG-II extrait de plantes traitées au 2F-Fuc, nous avons observé une altération de la dimérisation du RG-II et la présence d'oligosaccharides de poids moléculaires plus faibles que le monomère de RG-II. Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que ceci reflète un profil structural semblable à celui observé chez le mutant *mur1* avec une synthèse de chaînes A tronquées. Pour confirmer cette hypothèse, il serait envisageable de réaliser le profil électrophorétique du mutant et de déterminer la structure précise du RG-II de plantes traitées avec des concentrations croissantes de 2F-Fuc par chromatographie liquide couplée à une spectrométrie de masse. De plus, sachant que la synthèse golgienne est un évènement séquentiel et que l'ajout des chaînes latérales du RG-II sur le squelette HG suivrait

un ordre conservé, il est possible d'envisager que la synthèse d'une chaîne incomplète suspendrait le transfert des autres chaînes. Une analyse structurale performante et sensible permettrait également de vérifier cette hypothèse.

Dans la paroi primaire des plantes terrestres, le D-Api fait partie des sucres retrouvés uniquement dans la structure du RG-II et joue un rôle crucial en tant que point de liaison avec le bore pour la dimérisation du RG-II. Choi *et al.* (2011) ont synthétisé l'UDP-2F-GlcA, précurseur de la synthèse de l'UDP-D-apiose et de l'UDP-D-xylose, et ont montré son effet inhibiteur sur l'enzyme AXS purifiée. Aucune étude physiologique n'a été poursuivie or il a été montré par Ahn *et al.* (2006) qu'une diminution de l'activité de cette enzyme chez *N. benthamiana* entraînait une altération de la structure du RG-II. Ainsi, afin de cibler le RG-II, il serait envisageable d'étudier l'effet de l'UDP-2F-GlcA sur le développement des plantes et de comparer les résultats avec ceux que nous avons obtenu avec le 2F-Fuc et ceux décrits par Ahn *et al.* (2006).

Les résultats obtenus *via* l'utilisation du 2F-Fuc mettent en avant l'intérêt des sucres fluorés dans l'étude de la synthèse et la fonction de la paroi végétale. Ces analogues offrent l'avantage de permettre d'obtenir des phénotypes dose-dépendants, au cas où l'inhibition soit létale, et de contrôler le stade de développement ou le tissu à cibler, ce qui est difficilement réalisable par une approche de génétique fonctionnelle classique. Ainsi, l'étude de l'effet d'autres analogues fluorés sur les glycosyltransférases impliquées dans la synthèse des composés pariétaux pourrait être envisagée. Afin de s'affranchir d'un effet sur la structure du RG-II qui engendre souvent des défauts de croissance de la plante et peut masquer l'effet provenant de l'altération structurale d'un autre composé, il serait judicieux de choisir des analogues de sucres qui ne sont pas engagés dans le squelette principal du RG-II, tels que le 2-désoxy 2F-Xyl ou le 2-désoxy 2F-Ara. En effet, les résidus Ara et Xyl sont présents comme substituants latéraux et leurs absences ne devraient pas perturber la capacité du RG-II à se dimériser. Le 2-désoxy 2F-Glc que nous avons testé en parallèle du 2F-Fuc et qui inhibe l'élongation de la racine d'*Arabidopsis*, semble être également un bon candidat. La position de l'atome de fluor semble influencer l'effet inhibiteur puisque les dérivés fluorés en 3 et 4 du glucose avaient un effet moindre sur la croissance d'*Arabidopsis*. La position de l'atome de fluor, peut moduler l'effet inhibiteur sur la glycosyltransférase, l'analogue peut soit empêcher complètement le transfert du sucre-activé ou bien celui-ci peut être transféré dans le polysaccharide en cours de synthèse mais bloquer son élongation. L'analyse de l'effet de ces molécules sur le tube pollinique constitue une approche complémentaire qui permet de tester la spécificité d'organe.

Le phénotype racinaire provoqué par la croissance de la plante en présence de 2F-Fuc est similaire à ce qui peut être observé sur des plantes cultivées en condition de carence en bore. Le bore, nutriment essentiel, est retrouvé majoritairement lié au RG-II dans la paroi, permettant sa dimérisation et serait essentielle au processus d'élongation cellulaire. (Kobayashi *et al.*, 1996 ; O'Neill *et al.*, 2004). Or un traitement au 2F-Fuc affecte la structure du RG-II qui n'est plus favorable à sa dimérisation et à la fixation du bore, par conséquent, ce dernier ne peut plus être stocké dans la paroi par le RG-II ce qui provoque des effets considérables sur l'architecture racinaire. Cette dernière est régulée par plusieurs hormones de croissance telles que l'auxine, les cytokinines ou encore l'éthylène. L'équilibre entre ces différentes hormones est très fragile, ainsi, le dérèglement de l'une peut avoir des conséquences sur une autre. Plusieurs études ont apporté des preuves du lien entre carence en bore et balance hormonale dans les changements observés au niveau racinaire (Martín-Rejano *et al.*, 2011 ; Abreu *et al.*, 2014). Dans un premier temps, il serait envisageable d'analyser l'effet du 2F-Fuc sur la répartition des hormones dans la racine en utilisant des lignées mutantes d'*Arabidopsis* contenant un gène rapporteur témoin, telles que les lignées DR5 :: GUS ou GH3 :: GUS pour l'auxine (Ulmasov *et al.*, 1997 ; Bierfreund *et al.*, 2003), EBS :: GUS pour l'éthylène (Stepanova *et al.*, 2007). Dans un second temps, la modification des balances hormonales pourrait être quantifiée en dosant les principales hormones de croissance par spectrométrie de masse (Edlund *et al.*, 1995 ; Forcat *et al.*, 2008). Ces régulations hormonales peuvent avoir lieu à différents niveaux, leur biosynthèse, leur perception, leur transport ou encore leur voie de transduction peuvent être altérées. Ainsi, une analyse transcriptomique par RT-qPCR des plantules traitées permettrait de suivre le profil d'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans chacune de ces étapes et d'identifier celles qui impliquent la modification de l'architecture racinaire sous traitement au 2F-Fuc.

4. Une fonction du bore à reconsidérer ?

Dans notre étude, le phénotype racinaire est en partie restauré par ajout de bore même lors de l'inhibition de la synthèse du RG-II provoquée par le 2F-Fuc. Faudrait-il reconsidérer le rôle du complexe bore-RG-II ? D'une part, une voie de signalisation pourrait découler de la proportion de RG-II lié au bore pour réguler l'élongation cellulaire, impliquant les hormones de croissance, comme il a récemment été évoqué dans la revue de Funakawa & Miwa (2015). D'autre part, la forme dimérisée du RG-II, impliquée dans le maintien des propriétés physiques de la paroi, sert de stockage du minéral, qui lui, aurait un rôle supplémentaire à envisager. Enfin

le bore pourrait se lier à d'autres molécules que les pectines, ce qui a été suggéré pour des glycolipides ou encore des glycoprotéines au niveau de groupements *cis*-diol (Brown *et al.*, 2002 ; Wimmer *et al.*, 2009), attribuant un rôle du bore dans l'intégrité membranaire. Ainsi, il serait possible de suivre l'approche expérimentale de Voxeur *et al.* (2014) menée sur les GIPCs. Lorsqu'un extrait de GIPCs est traité par un mélange butanol/eau, une couche trouble caractéristique de ces lipides se forme. Cette couche est d'autant plus importante lorsque les cellules sont cultivées en condition de carence en bore ce qui témoigne d'une solubilité accrue de ces glycolipides due à l'absence de bore. Si un traitement des cellules au 2F-Fuc favorise la solubilité des GIPCs, ceci traduirait que l'analogue fluoré du fucose perturbe aussi la structure de la membrane en inhibant l'association des GIPCs avec le bore.

A sa fonction primaire de stabilisateur des structures membranaires et pariétales, s'ajouterait un rôle modulateur de l'interaction de facteurs de transcription avec leur gène cible (González-Fontes *et al.*, 2008) pouvant impliquer des intermédiaires protéiques. Par exemple, de nombreux processus physiologiques font intervenir la protéine 14-3-3 qui agit sur des protéines phosphorylées (de type facteurs de transcription, canaux ioniques, kinase...) en modifiant leur activité, leur stabilité, leur conformation ou encore leur localisation (Denison *et al.*, 2011). Il a été suggéré par Gonzales-Fontes *et al.* (2014) que le calcium couplée à la protéine calmoduline pouvait être le senseur de la concentration intracellulaire en bore et déclencher plusieurs voies de transduction.

Cette dernière hypothèse qui implique le bore dans la signalisation cellulaire ouvre une perspective considérable dont les limites sont difficiles à définir, car ces facteurs de transcription peuvent être impliqués dans de nombreux processus que ce soit dans la régulation des propriétés mécaniques de la paroi, la régulation de la balance hormonale... (**Fig. 41**).

Conclusion et perspectives

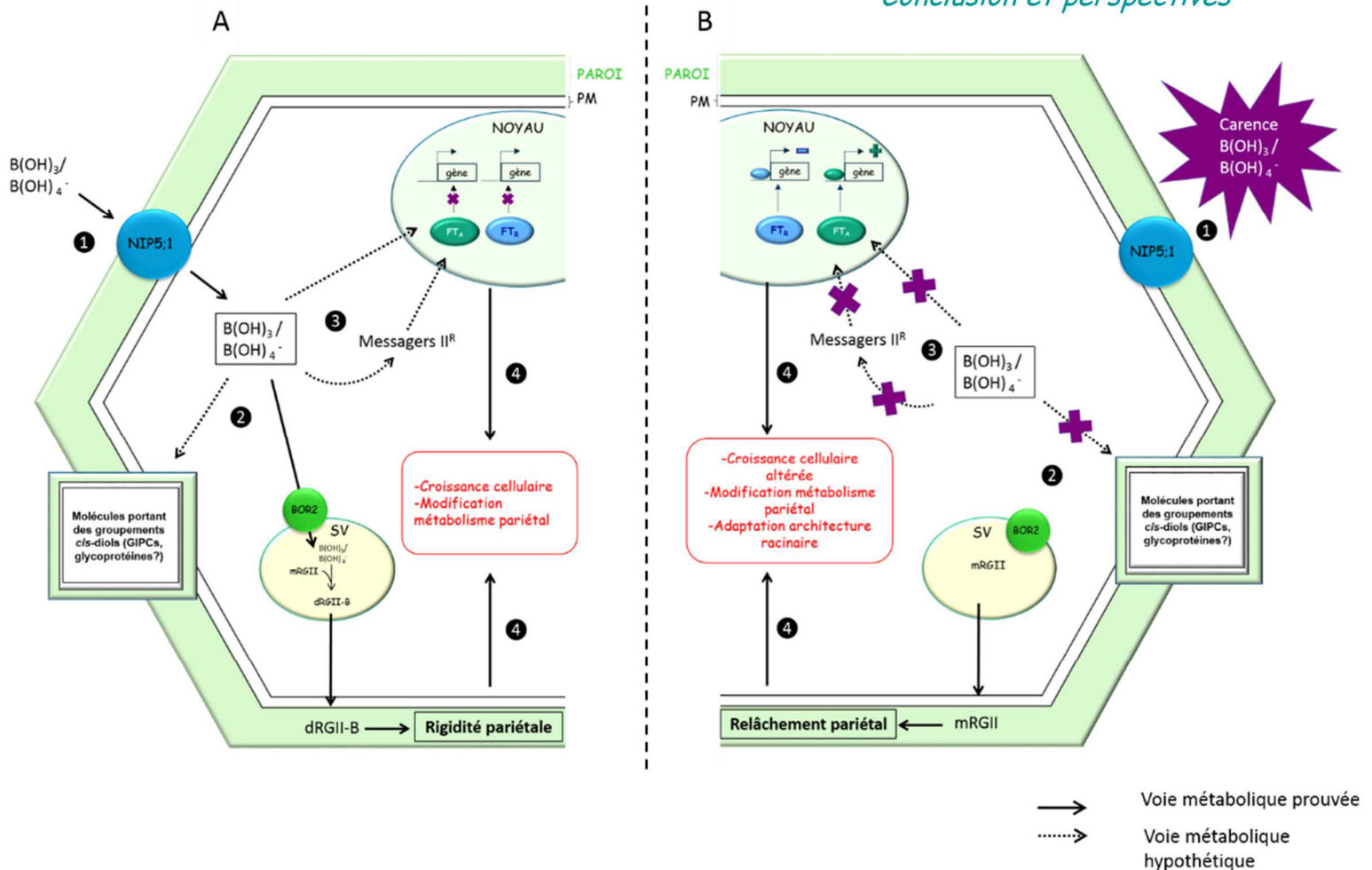
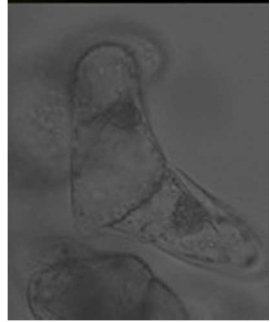
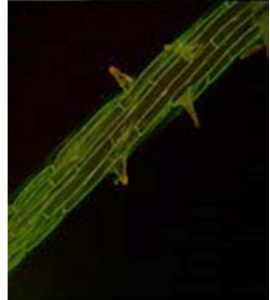
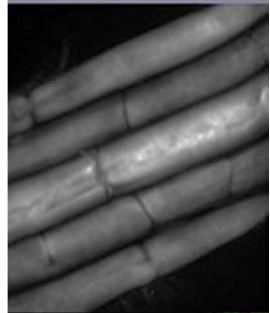
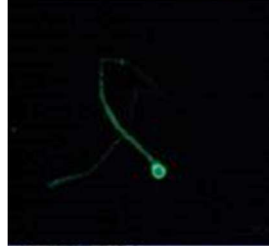
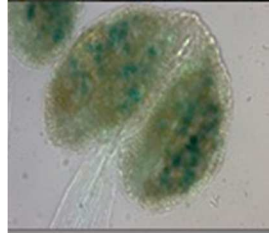


Figure 41 : Rôle structural du bore dans la paroi cellulaire et modèle hypothétique du bore en tant que molécule signal dans les cellules racinaires.

A. ① Le bore présent dans le sol entre dans la cellule par le transporteur NIP5 ;1 (Takano *et al.*, 2006). ② Puis, une partie du bore va entrer dans les vésicules de sécrétion *via* le transporteur BOR2 où il va permettre la dimérisation de monomères de RG-II (Miwa *et al.*, 2013 ; Chormova *et al.*, 2014a). Le RG-II dimérisé est sécrété vers la paroi où il renforce la rigidité pariétale et permet d'y stocker le bore. Ce dernier stabiliserait d'autres molécules de la paroi telles que des glycoprotéines, et des lipides de la membrane tels que les GIPCs (Wimmer *et al.*, 2009 ; Voxeur *et al.*, 2014). ③ Le bore intracellulaire régulerait l'interaction des facteurs de transcription avec leur gène cible au niveau nucléaire soit seul, associé à des protéines ou soit par l'intermédiaire de messagers secondaires Cette voie reste hypothétique. ④ La croissance de la cellule, l'architecture racinaire et le métabolisme pariétal sont modulés en réponse à l'état de rigidité pariétale et en réponse aux gènes transcrits selon l'état nutritionnel de la cellule. B. ① Lors d'une carence en bore, la concentration en bore intracellulaire ne permet plus la dimérisation du RG-II ② et des autres molécules, ce qui va entraîner un relâchement de la paroi. La liaison des facteurs de transcription avec leur gène cible n'est plus inhibée par le bore ou ses messagers secondaires ③ permettant une réponse de la cellule aux changements des propriétés mécaniques de la paroi et d'adapter la morphologie de l'organe à un état de carence. FT_A/FT_R : facteur de transcription activateur/répresseur ; mRG-II : monomère de RG-II ; dRG-II : dimère de RG-II ; B(OH)₃/B(OH)₄⁻ : acide borique ; PM : membrane plasmique ; SV : vésicule de sécrétion. Schéma constitué d'après González-Fontes *et al.* (2008) et Miwa *et al.* (2013).



V-REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Abramoff MD, Magalhães PJ, Ram SJ. 2004.** Image processing with ImageJ. *Biophotonics international*. **11**: 36–42.
- Abreu I, Poza L, Bonilla I, Bolaños L. 2014.** Boron deficiency results in early repression of a cytokinin receptor gene and abnormal cell differentiation in the apical root meristem of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol. Biochem.* **77**: 117-21.
- Ahn J, Verma R, Kim M, Lee J, Kim Y, Bang J, Reiter W, Pai H. 2006.** Depletion of UDP-D-apiose/UDP-D-xylose synthases results in rhamnogalacturonan-II deficiency, cell wall thickening, and cell death in higher plants. *J. Biol. Chem.* **281**(19): 13708-13717.
- Anderson CT, Carroll A, Akhmetova L, Somerville C. 2010.** Real-time imaging of cellulose reorientation during cell wall expansion in *Arabidopsis* roots. *Plant Physiol.* **152**(2): 787-796.
- Anderson CT, Wallace IS, Somerville CR. 2012.** Metabolic click-labeling with a fucose analog reveals pectin delivery, architecture, and dynamics in *Arabidopsis* cell walls. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **109**(4): 1329-1334.
- Anderson CT, Wallace IS. 2012.** Illuminating the wall: using click chemistry to image pectins in *Arabidopsis* cell walls. *Plant Signal Behav.* **7**(6): 661-663.
- APG III. 2009.** An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Bot. J. Linn. Soc.* **161**(2): 105-121.
- Arvidsson S, Kwasniewski M, Riaño-Pachón DM, Mueller-Roeber B. 2008.** QuantPrime--a flexible tool for reliable high-throughput primer design for quantitative PCR. *BMC Bioinformatics.* **9**: 465.
- Atmodjo MA, Sakuragi Y, Zhu X, Burrell AJ, Mohanty SS, Atwood JA, III, Orlando R, Scheller HV, Mohnen D. 2011.** Galacturonosyltransferase (GAUT)1 and GAUT7 are the core of a plant cell wall pectin biosynthetic homogalacturonan:galacturonosyltransferase complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **108**: 20225-20230
- Atmodjo MA, Hao Z, Mohnen D. 2013.** Evolving views of pectin biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* **64**: 747-779.
- Audry M, Jeanneau C, Imberty A, Harduin-Lepers A, Delannoy P, Breton C. 2011.** Current trends in the structure-activity relationships of sialyltransferases. *Glycobiology.* **21**(6): 716-26.

B

- Bach RD. 2009.** Ring strain energy in the cyclooctyl system. The effect of strain energy on [3 + 2] cycloaddition reactions with azides. *J. Am. Chem. Soc.* **131**(14): 5233-5243.
- Bakker H, Routier F, Ashikov A, Neumann D, Bosch D, Gerardy-Schahn R. 2008.** A CMP-sialic acid transporter cloned from *Arabidopsis thaliana*. *Carbohydrate Research* **343**: 2148-2152.

- Bakker PA, Berendsen RL, Doornbos RF, Wintermans PC, Pieterse CM. 2013.** The rhizosphere revisited: root microbiomics. *Front Plant Sci.* **4**: 165.
- Baldwin TC, Handford MG, Yuseff MI, Orellana A, Dupree P. 2001.** Identification and characterization of GONST1, a golgi-localized GDP-mannose transporter in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **13**(10): 2283-2295.
- Bar-Peled M, O'Neill MA. 2011.** Plant nucleotide sugar formation, interconversion, and salvage by sugar recycling. *Annu. Rev. Plant. Biol.* **62**: 127-155.
- Bar-Peled M, Urbanowicz BR, O'Neill MA. 2012.** The synthesis and origin of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II - insights from nucleotide sugar formation and diversity. *Front. Plant. Sci.* **11**: 3-92.
- Baskin JM, Prescher JA, Laughlin ST, Agard NJ, Chang PV, Miller IA, Lo A, Codelli JA, Bertozzi CR. 2007.** Copper-free click chemistry for dynamic *in vivo* imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **104**(43): 16793-16797.
- Baskin TI, Peret B, Baluška F, Benfey PN, Bennett M, Forde BG, Gilroy S, Helariutta Y, Hepler PK, Leyser O, Masson PH, Muday GK, Murphy AS, Poethig S, Rahman A, Roberts K, Scheres B, Sharp RE, Somerville C. 2010.** Shootward and rootward: peak terminology for plant polarity. *Trends Plant Sci.* **15**(11): 593-594.
- Bassil E, Hu H, Brown PH. 2004.** Use of phenylboronic acids to investigate boron function in plants. Possible role of boron in transvacuolar cytoplasmic strands and cell-to-wall adhesion. *Plant Physiol.* **136**(2): 3383-3395.
- Beekman T, Friml J. 2010.** Nitrate contra auxin: nutrient sensing by roots. *Dev. Cell.* **18**(6): 877-878.
- Belhaj K, Chaparro-Garcia A, Kamoun S, Nekrasov V. 2013.** Plant genome editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system. *Plant Methods.* **9**(1):39.
- Benfey PN, Linstead PJ, Roberts K, Schiefelbein JW, Hauser MT, Aeschbacher RA. 1993.** Root development in *Arabidopsis*: four mutants with dramatically altered root morphogenesis. *Development.* **119**(1): 57-70.
- Benfey PN, Bennett M, Schiefelbein J. 2010.** Getting to the root of plant biology: impact of the *Arabidopsis* genome sequence on root research. *Plant J.* **61**: 992-1000.
- Benen JAE, Visser J. 2003.** Pectate and pectin lyases. In (eds) Whitaker JR, Voragen A, Wong DWS, *Handbook of Food Enzymology* New York: Dekker. 1029-1041.
- Best MD. 2009.** Click chemistry and bioorthogonal reactions: unprecedented selectivity in the labeling of biological molecules. *Biochemistry.* **48**(28): 6571-6584.
- Bierfreund NM, Reski R, Decker EL. 2003.** Use of an inducible reporter gene system for the analysis of auxin distribution in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Cell. Rep.* **21**(12): 1143-1152.
- Blilou I, Xu J, Wildwater M, Willemsen V, Paponov I, Friml J, Heidstra R, Aida M, Palme K, Scheres B. 2005.** The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature.* **433**: 39-44.
- Boavida LC, McCormick S. 2007.** Temperature as a determinant factor for increased and reproducible *in vitro* pollen germination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **52**: 570-582.

Bonin CP, Potter I, Vanzin GF, Reiter WD. 1997. The *MURI* gene of *Arabidopsis thaliana* encodes an isoform of GDP-D-mannose-4,6-dehydratase, catalyzing the first step in the *de novo* synthesis of GDP-L-fucose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **94**(5): 2085-2090.

Bosch M, Cheung AY, Hepler PK. 2005. Pectin methylesterase, a regulator of pollen tube growth. *Plant Physiol.* **138**(3): 1334-1346.

Bourge M, Fort C, Soler MN, Satiat-Jeunemaître B, Brown SC. 2015. A pulse-chase strategy combining click-EdU and photoconvertible fluorescent reporter: tracking Golgi protein dynamics during the cell cycle. *New Phytol.* **205**(2): 938-950.

Bouton S, Leboeuf E, Mouille G, Leydecker MT, Talbotec J, Granier F, Lahaye M, Höfte H, Truong HN. 2002. *QUASIMODOI* encodes a putative membrane-bound glycosyltransferase required for normal pectin synthesis and cell adhesion in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **14**(10): 2577-2590.

Boyce M, Bertozzi CR. 2011. Bringing chemistry to life. *Nat. Methods.* **8**(8): 638-642.

Brady JD, Sadler IH, Fry SC. 1996. Di-isodityrosine, a novel tetrameric derivative of tyrosine in plant cell wall proteins: a new potential cross-link. *Biochem. J.* **315**: 323-327.

Brewbaker JL, Kwack BH. 1963. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. *Am. J. Bot.* **50**: 859-865.

Brown PH, Bellaloui N, Wimmer MA, Bassil ES, Ruiz J, Hu H, Pfeffer H, Dannel F, Römheld V. 2002. Boron in plant biology. *Plant Biol.* **4**: 205-223.

Buffetto F, Ropartz D, Zhang XJ, Gilbert HJ, Guillon F, Ralet MC. 2014. Recovery and fine structure variability of RGII sub-domains in wine (*Vitis vinifera* Merlot). *Ann Bot.* **114**(6): 1327-1337.

Burkart MD, Vincent SP, Düffels A, Murray BW, Ley SV, Wong CH. 2000. Chemo-enzymatic synthesis of fluorinated sugar nucleotide: useful mechanistic probes for glycosyltransferases. *Bioorg. Med. Chem.* **8**(8): 1937-1946.

e

Caffall KH, Mohnen D. 2009. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydr. Res.* **344**(14): 1879-1900.

Cai G, Faleri C, Del Casino C, Emons AM, Cresti M. 2011. Distribution of callose synthase, cellulose synthase, and sucrose synthase in tobacco pollen tube is controlled in dissimilar ways by actin filaments and microtubules. *Plant Physiol.* **155**(3):1169-1190.

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.

Carpita N, McCann M. 2000. The cell wall. In (eds) Buchanan BB, Gruissem W and Jones RL, *Biochemistry and molecular biology of plants*, American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, USA. 52-108.

Cassab GI. 1998. Plant cell wall proteins. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**: 281-309.

Cavalier DM, Keegstra K. 2006. Two xyloglucan xylosyltransferases catalyze the addition of multiple xylosyl residues to cellohexaose. *J. Biol. Chem.* **281**: 34197-34207.

- Cavalier DM, Lerouxel O, Neumetzler L, Yamauchi K, Reinecke A, Freshour G, Zabolina OA, Hahn MG, Burgert I, Pauly M, Raikhel NV, Keegstra K. 2008.** Disrupting two *Arabidopsis thaliana* xylosyltransferase genes results in plants deficient in xyloglucan, a major primary cell wall component. *Plant Cell*. **6**: 1519-1537.
- Chebli Y, Kaneda M, Zerzour R, Geitmann A. 2012.** The cell wall of the *Arabidopsis* pollen tube—spatial distribution, recycling, and network formation of polysaccharides. *Plant Physiol*. **160**: 1940-1955.
- Chen XY, Kim J. 2009.** Callose synthesis in higher plants. *Plant Signal Behav*. **4**(6): 489-492.
- Choi SH, Ruszczycy MW, Zhang H, Liu HW. 2011.** A fluoro analogue of UDP- α -D-glucuronic acid is an inhibitor of UDP- α -D-apiose/UDP- α -D-xylose synthase. *Chem. Commun*. **47**(36): 10130-10132.
- Chormova D, Messenger DJ, Fry SC. 2014a.** Boron bridging of rhamnogalacturonan-II, monitored by gel electrophoresis, occurs during polysaccharide synthesis and secretion but not post-secretion. *Plant J*. **77**(4): 534-546.
- Chormova D, Messenger DJ, Fry SC. 2014b.** Rhamnogalacturonan-II cross-linking of plant pectins via boron bridges occurs during polysaccharide synthesis and/or secretion. *Plant Signal Behav*. **9**(3): e28169.
- Clough SJ, Bent AF. 1998.** Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. **16**: 735-743.
- Clouse SD, Langford M, McMorris TC. 1996.** A brassinosteroid-insensitive mutant in *Arabidopsis thaliana* exhibits multiple defects in growth and development. *Plant Physiol*. **111**(3): 671-678.
- Cocuron JC, Lerouxel O, Drakakaki G, Alonso AP, Liepman AH, Keegstra K, Raikhel NV, Wilkerson CG. 2007.** A gene from the cellulose synthase-like C family encodes a β -1,4 glucan synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**: 8550-8555.
- Coimbra S, Almeida J, Junqueira V, Costa ML, Pereira LG. 2007.** Arabinogalactan proteins as molecular markers in *Arabidopsis thaliana* sexual reproduction. *J. Exp. Bot*. **58**(15-16): 4027-4035.
- Coimbra S, Costa M, Jones B, Mendes MA, Pereira LG. 2009.** Pollen grain development is compromised in *Arabidopsis agp6 agp11* null mutants. *J. Exp. Bot*. **60**(11): 3133-3142.
- Condit CM, Meagher RB. 1987.** Expression of a gene encoding a glycine-rich protein in petunia. *Mol. Cell. Biol*. **7**(12): 4273-4279.
- Cosgrove DJ. 2000a.** Expansive growth of plant cell walls. *Plant Physiol. Biochem*. **38**: 1-16
- Cosgrove DJ. 2000b.** Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature*. **407**: 321-326.
- Cosgrove DJ, Li LC, Cho HT, Hoffmann-Benning S, Moore RC, Blecker D. 2002.** The growing world of expansins. *Plant Cell Physiol*. **43**: 1236-1244.
- Cosgrove DJ. 2005.** Growth of the plant cell wall. *Nat. Rev. Mol. Cell. Bio*. **6**: 850-861.



- Dardelle F, Lehner A, Ramdani Y, Bardor M, Lerouge P, Driouich A, Mollet JC. 2010.** Biochemical and immunocytological characterizations of *Arabidopsis* pollen tube cell wall. *Plant Physiol.* **153**(4): 1563-1576.
- Dardelle F, Le Mauff F, Lehner A, Loutelier-Bourhis C, Bardor M, Rihouey C, Causse M, Lerouge P, Driouich A, Mollet JC. 2015.** Pollen tube cell walls of wild and domesticated tomatoes contain arabinosylated and fucosylated xyloglucan. *Ann Bot.* **115**(1): 55-66.
- Darvill AG, McNeil M, Albersheim P. 1978.** Structure of plant cell walls. *Plant Physiol.* **62**: 418-422.
- Daskalova SM, Pah AR, Baluch DP, Lopez LC. 2009.** The *Arabidopsis thaliana* putative sialyltransferase resides in the Golgi apparatus but lacks the ability to transfer sialic acid. *Plant Biol.* **11**: 284-299.
- Datema R, Schwarz RT, Rivas LA, Lezica RP. 1983.** Inhibition of β -1,4-glucan biosynthesis by deoxyglucose. *Plant Physiol.* **71**(1): 76-81.
- Davis J, Brandizzi F, Liepman AH, Keegstra K. 2010.** *Arabidopsis* mannan synthase CSLA9 and glucan synthase CSLC4 have opposite orientations in the Golgi membrane. *Plant J.* **64**: 1028-1037
- Dehnert KW, Baskin JM, Laughlin ST, Beahm BJ, Naidu NN, Amacher SL, Bertozzi CR. 2012.** Imaging the sialome during zebrafish development with copper-free click chemistry. *ChemBiochem.* **13**(3): 353-357.
- Delmas F, Petit J, Joubès J, Seveno M, Paccalet T, Hernould M, Lerouge P, Mouras M, Chevalier C. 2003.** The gene expression and enzyme activity of plant 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid-8-phosphate synthase are preferentially associated with cell division in a cell cycle-dependent manner. *Plant Physiol.* **133**: 348-360.
- Delmas F, Séveno M, Northey JGB, Hernould M, Lerouge P, McCourt P, Chevalier C. 2008.** The synthesis of the rhamnogalacturonan II component 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid (Kdo) is required for pollen tube growth and elongation. *J. Exp. Bot.* **59**: 2639-2647.
- Deng Y, Wang W, Li W-Q, Xia C, Liao HZ, Zhang XQ, Ye D. 2010.** MALE GAMETOPHYTE DEFECTIVE 2, encoding a sialyltransferase-like protein, is required for normal pollen germination and pollen tube growth in *Arabidopsis*. *J. Integr. Plant Biol.* **52**: 829-843.
- Denison FC, Paul AL, Zupanska AK, Ferl RJ. 2011.** 14-3-3 proteins in plant physiology. *Semin Cell Dev Biol.* **22**(7):720-727.
- Desbrosses GJ, Stougaard J. 2011.** Root nodulation: a paradigm for how plant-microbe symbiosis influences host developmental pathways. *Cell Host Microbe.* **10**(4): 348-358.
- Desnos T, Orbović V, Bellini C, Kronenberger J, Caboche M, Traas J, Höfte H. 1996.** *Procuste1* mutants identify two distinct genetic pathways controlling hypocotyl cell elongation, respectively in dark- and light-grown *Arabidopsis* seedlings. *Development.* **122**(2): 683-693.
- de Souza A, Hull PA, Gille S, Pauly M. 2014.** Identification and functional characterization of the distinct plant pectin esterases PAE8 and PAE9 and their deletion mutants. *Planta.* **240**(5): 1123-1138.
- Dilokpimol A, Poulsen CP, Vereb G, Kaneko S, Schulz A, Geshi N. 2014.** Galactosyltransferases from *Arabidopsis thaliana* in the biosynthesis of type II arabinogalactan: molecular interaction enhances enzyme activity. *BMC Plant Biol.* **3**: 14:90.

Doco T, O'Neill MA, Pellerin P. 2001. Determination of the neutral and acidic glycosyl-residue compositions of plant polysaccharides by GC-EI-MS analysis of the trimethylsilyl methyl glycoside derivatives. *Carbohydr. Polym.* **46**: 249-259.

Dolan L, Janmaat K, Willemsen V, Linstead P, Poethig S, Roberts K, Scheres B. 1993. Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development.* **119**(1): 71-84.

Doong RL, Gander JE, Ganson RJ, Jensen RA. 1992. The cytosolic isoenzyme of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase in *Spinacia oleracea* and other higher plants: extreme substrate ambiguity and other properties. *Physiol. Plant.* **84**(3): 351-360.

Driouich A, Follet-Gueye ML, Bernard S, Kousar S, Chevalier L, Vicré-Gibouin M, Lerouxel O. 2012. Golgi-mediated synthesis and secretion of matrix polysaccharides of the primary cell wall of higher plants. *Front. Plant Sci.* **3**(79): 1-15.

Dumont A, Malleron A, Awwad M, Dukan S, Vauzeilles B. 2012. Click-mediated labeling of bacterial membranes through metabolic modification of the lipopolysaccharide inner core. *Angew Chem. Int. Ed Engl.* **51**(13): 3143-3146.

Dumont M, Lehner A, Bouton S, Kiefer-Meyer MC, Voxeur A, Pelloux J, Lerouge P, Mollet JC. 2014. The cell wall pectic polymer rhamnogalacturonan-II is required for proper pollen tube elongation: implications of a putative sialyltransferase-like protein. *Ann Bot.* **114**(6): 1177-1188.

Dunkley TPJ, Hester S, Shadforth IP, Runions J, Weimar T, Hanton SL, Griffin JL, Bessant C, Brandizzi F, Hawes C, Watson RB, Dupree P, Lilley KS. 2006. Mapping the *Arabidopsis* organelle proteome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **103**: 6518-6523.

du Penhoat CH, Gey C, Pellerin P, Perez S. 1999. An NMR solution study of the mega-oligosaccharide, rhamnogalacturonan II. *J. Biomol. NMR.* **14**: 253-27110.



Ebert B, Rautengarten C, Guo X, Xiong G, Stonebloom S, Smith-Moritz AM, Herter T, Chan LJ, Adams PD, Petzold CJ, Pauly M, Willats WG, Heazlewood JL, Scheller HV. 2015. Identification and characterization of a golgi-localized UDP-xylose transporter family from *Arabidopsis*. *Plant Cell.* pii: tpc.114.133827

Edashige Y, Ishii T. 1998. Rhamnogalacturonan II from cell walls of *Cryptomeria japonica*. *Phytochemistry* **49**: 681-690.

Edlund A, Eklof S, Sundberg B, Moritz T, Sandberg G. 1995. A microscale technique for gas chromatography-mass spectrometry measurements of picogram amounts of indole-3-acetic acid in plant tissues. *Plant Physiol.* **108**(3):1043-1047.

Edmonds MK, Peddie V. 2006. Fluorinated analogues of biological molecules: accessing new chemical, physical and biological properties. *Chem N.Z.* **70**(1): 85-87.

Egelund J, Petersen BL, Motawia MS, Damager I, Faik A, Olsen CE, Ishii T, Clausen H, Ulvskov P, Geshi N. 2006. *Arabidopsis thaliana* *RGXT1* and *RGXT2* encode Golgi-localized (1,3)-alpha-D-xylosyltransferases involved in the synthesis of pectic rhamnogalacturonan-II. *The Plant Cell.* **18**: 2593-2607.

Egelund J, Damager I, Faber K, Olsen C-E, Ulvskov P, Petersen BL. 2008. Functional characterisation of a putative rhamnogalacturonan II specific xylosyltransferase. *FEBS letters*. **582**: 3217-3222.

Ellis M, Egelund J, Shultz CJ, Bacic A. 2010. Arabinogalactan-proteins: key regulators at the cell surface? *Plant Physiol*. **153**: 403-419.

Engleman EM, Esau K. 1964. The problem of callose deposition in phloem. *Science*. **144**(3618): 562.

Ermel FF, Vizoso S, Charpentier JP, Jay-Allemand C, Catesson AM, Couée I. 2000. Mechanisms of primordium formation during adventitious root development from walnut cotyledon explants. *Planta*. **211**(4): 563-74.

Esquerre-Tugaye MT, Mazau D. 1974. Effect of a fungal disease on extensin, the plant cell wall glycoprotein. *J. Exp. Bot*. **25**: 509-513.

Ess DH, Jones GO, Houk KN. 2008. Transition states of strain-promoted metal-free click chemistry: 1,3-dipolar cycloadditions of phenyl azide and cyclooctynes. *Org. Lett*. **10**: 1633-1636.

Estevez JM, Kieliszewski MJ, Khitrov N, Somerville C. 2006. Characterization of synthetic hydroxyproline-rich proteoglycans with arabinogalactan protein and extensin motifs in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. **142**: 458-470.

7

Fagard M, Desnos T, Desprez T, Goubet F, Refregier G, Mouille G, McCann M, Rayon C, Vernhettes S, Höfte H. 2000. *PROUSTE1* encodes a cellulose synthase required for normal cell elongation specifically in roots and dark-grown hypocotyls of *Arabidopsis*. *Plant Cell*. **12**(12): 2409-2424.

Faik A, Price NJ, Raikhel NV, Keegstra K. 2002. An *Arabidopsis* gene encoding an α -xylosyltransferase involved in xyloglucan biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **99**: 7797-7802.

Fayant P, Girlanda O, Chebli Y, Aubin CE, Villemure I, Geitmann A. 2010. Finite element model of polar growth in pollen tubes. *Plant Cell*. **22**: 2579-2593.

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

Ferrieri AP, Appel H, Ferrieri RA, Schultz JC. 2012. Novel application of 2-[(18)F]fluoro-2-deoxy-D-glucose to study plant defenses. *Nucl. Med. Biol*. **39**(8): 1152-1160.

Festucci-Buselli RA, Otoni WC, Joshi CP. 2007. Structure, organization, and functions of cellulose synthase complexes in higher plants. *Braz. J. Plant Physiol*. **19**(1): 1-13.

Fleischer A, Titel C, Ehwald R. 1998. The boron requirement and cell wall properties of growing and stationary suspension-cultured *Chenopodium album* L. cells. *Plant Physiol*. **117**(4): 1401-1410.

Fleischer A, O'Neill MA, Ehwald R. 1999. The pore size of non-graminaceous plant cell walls is rapidly decreased by borate ester cross-linking of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II. *Plant Physiol*. **121**(3): 829-838.

Follet-Gueye ML, Mollet JC, Vicré-Gibouin M, Bernard S, Chevalier L, Plancot B, Dardelle F, Ramdani Y, Coimbra S, Driouich A. 2012. Immuno-glyco-imaging in plant cells: localization of cell

wall carbohydrate epitopes and their biosynthesizing enzymes. In (eds) Dehghani H, *Immunocytochemistry*, InTech Publisher. 297-320.

Forcat S, Bennett MH, Mansfield JW, Grant MR. 2008. A rapid and robust method for simultaneously measuring changes in the phytohormones ABA, JA and SA in plants following biotic and abiotic stress. *Plant Methods*. 4:16.

Fry SC, York WS, Albersheim P, Darvill A, Hayashi T, Joseleau JP, Kato Y, Lorences EP, Maclachlan GA, McNeil M, Mort AJ, Grant Reid JS, Seitz HU, Selvendran RR, Voragen AGJ, White AR. 1993. An unambiguous nomenclature for xyloglucan-derived oligosaccharides. *Physiol. Plant*. 89: 1-3.

Fu J, Mort A. 1997. Progress towards identifying a covalent crosslink between xyloglucan and rhamnogalacturonan in cotton cell walls. *Plant Physiol*. 114S: 83.

Funakawa H, Miwa K. 2015. Synthesis of borate cross-linked rhamnogalacturonan II. *Front. Plant Sci*. 6: 223.

G

Geserick C, Tenhaken R. 2013. UDP-sugar pyrophosphorylase controls the activity of proceeding sugar-1-kinases enzymes. *Plant Signal. Behav*. 8(9). pii: e25478.

Gilbert L, Alhag Dow M, Nunes-Nesi A, Quemener B, Guillon F, Bouchet B, Faurobert M, Gouble B, Page D, Garcia V, Petit J, Stevens R, Causse M, Fernie AR, Lahaye M, Rothan C, Baldet P. 2009. GDP-D-mannose 3,5-epimerase (GME) plays a key role at the intersection of ascorbate and non-cellulosic cell-wall biosynthesis in tomato. *Plant J*. 60(3): 499-508.

Gille S, de Souza A, Xiong G, Benz M, Cheng K, Schultink A, Reza IB, Pauly M. 2011. O-acetylation of *Arabidopsis* hemicellulose xyloglucan requires AXY4 or AXY4L, proteins with a TBL and DUF231 domain. *Plant Cell*. 23(11): 4041-4053.

Golovchenko VV, Ovodova RG, Shashkov AS, Ovodov YS. 2002. Structural studies of the pectic polysaccharide from duckweed *Lemna minor* L. *Phytochem*. 60(1): 89-97.

González-Carranza ZH, Whitelaw CA, Swarup R, Roberts JA. 2002. Temporal and spatial expression of a polygalacturonase during leaf and flower abscission in oilseed rape and *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 128(2): 534-543.

González-Carranza ZH, Elliott KA, Roberts JA. 2007. Expression of polygalacturonases and evidence to support their role during cell separation processes in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot*. 58(13): 3719-3730.

González-Fontes A, Rexach J, Navarro-Gochicoa MT, Herrera-Rodríguez MB, Beato VM, Maldonado JM, Camacho-Cristóbal JJ. 2008. Is boron involved solely in structural roles in vascular plants? *Plant Signal Behav*. 3(1): 24-26.

Green PB. 1962. Mechanism for plant cellular morphogenesis. *Science*. 138(3548): 1404-1405.

Gutierrez L, Bussell JD, Pacurar DI, Schwambach J, Pacurar M, Bellini C. 2009. Phenotypic plasticity of adventitious rooting in *Arabidopsis* is controlled by complex regulation of AUXIN RESPONSE FACTOR transcripts and microRNA abundance. *The Plant Cell*. 21: 3119-3132.



Hahlbrock K, Knobloch KH, Kreuzaler F, Potts JRM, Wellmann E. 1976. Coordinated induction and subsequent activity changes of two groups of metabolically interrelated enzymes. Light-induced synthesis of flavonoid glycosides in cell suspension cultures of *Petroselinum hortense*. *Eur. J. Biochem.* **61**: 199-206.

Hall Q, Cannon MC. 2002. The cell wall hydroxyproline-rich glycoprotein RSH is essential for normal embryo development in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **14**(5): 1161-1172.

Handford MG, Sicilia F, Brandizzi F, Chung JH, Dupree P. 2004. *Arabidopsis thaliana* expresses multiple Golgi-localised nucleotide-sugar transporters related to GONST1. *Mol. Genet. Genomics.* **272**(4): 397-410.

Handford M, Rodríguez-Furlán C, Marchant L, Segura M, Gómez D, Alvarez-Buylla E, Xiong GY, Pauly M, Orellana A. 2012. *Arabidopsis thaliana* AtUTr7 encodes a golgi-localized UDP-glucose/UDP-galactose transporter that affects lateral root emergence. *Mol. Plant.* **5**(6): 1263-1280

Hao Z, Hong S, Chen X, Chen PR. 2011. Introducing bioorthogonal functionalities into proteins in living cells. *Acc. Chem. Res.* **44**(9): 742-751.

Harholt J, Suttangkakul A, Vibe Scheller H. 2010. Biosynthesis of pectin. *Plant Physiol.* **153**(2): 384-395.

Harholt J, Jensen JK, Verhertbruggen Y, Søgaard C, Bernard S, Nafisi M, Poulsen CP, Geshi N, Sakuragi Y, Driouich A, Knox JP, Scheller HV. 2012. ARAD proteins associated with pectic arabinan biosynthesis form complexes when transiently overexpressed in planta. *Planta.* **236**(1): 115-128.

Harris D, Bulone V, Ding SY, DeBolt S. 2010. Tools for cellulose analysis in plant cell walls. *Plant Physiol.* **153**(2): 420-426.

Hattori E, Uchida H, Harada N, Ohta M, Tsukada H, Hara Y, Suzuki T. 2008. Incorporation and translocation of 2-deoxy-2-[(18)F]fluoro-D-glucose in *Sorghum bicolor* (L.) Moench monitored using a planar positron imaging system. *Planta.* **227**(5): 1181-1186.

Held MA, Tan L, Kamyab A, Hare M, Shpak E, Kieliszewski MJ. 2004. Di-isodityrosine is the intermolecular cross-link of isodityrosine-rich extensin analogs cross-linked *in vitro*. *J. Biol.Chem.* **279**: 55474-55482.

Hitz WD, Schmitt MR, Card PJ, Giaquinta RT. 1985. Transport and metabolism of 1'-fluorosucrose, a sucrose analog not subject to invertase hydrolysis. *Plant Physiol.* **77**(2): 291-295.

Hoch HC, Galvani CD, Szarowski DH, Turner JN. 2005. Two new fluorescent dyes applicable for visualization of fungal cell walls. *Mycologia.* **97**(3): 580-588.

Holdaway-Clarke TL, Weddle NM, Kim S, Robi A, Parris C, Kunkel JG, Hepler PK. 2003. Effect of extracellular calcium, pH and borate on growth oscillations in *Lilium formosanum* pollen tubes. *J. Exp. Bot.* **54**: 65-72.

Hong V, Steinmetz NF, Manchester M, Finn MG. 2010. Labeling live cells by copper-catalyzed alkyne-azide click chemistry. *Bioconjug. Chem.* **21**(10): 1912-1916.

Hood EE, Gelvin SB, Melchers LS, Hoekema A. 1993. New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Res.* **2**: 33-50.

Hou WC, Chang WH, Jiang CM. 1999. Qualitative distinction of carboxyl group distributions in pectins with ruthenium red. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 40: 115-119.

Hsu TL, Hanson SR, Kishikawa K, Wang SK, Sawa M, Wong CH. 2007. Alkynyl sugar analogs for the labeling and visualization of glycoconjugates in cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 104(8): 2614-2619.

Hughes J, McCully ME. 1975. The use of an optical brightener in the study of plant structure. *Stain Technol.* 50(5): 319-329.

Huisgen, R. 1984. In 1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry; Padwa, A., Ed.; Wiley: New York. 1: 1-176.

9

Ishii T, Matsunaga T. 1996. Isolation and characterization of a boron-rhamnogalacturonan-II complex from cell walls of sugar beet pulp. *Carbohydrate Research* 284: 1-9.

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.

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.

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

Iwai H, Hokura A, Oishi M, Chida H, Ishii T, Sakai S, Satoh S. 2006. The gene responsible for borate cross-linking of pectin rhamnogalacturonan-II is required for plant reproductive tissue development and fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 103(44): 16592-16607.

9

Jacobs AK, Lipka V, Burton RA, Panstruga R, Strizhov N, Schulze-Lefert P, Fincher GB. 2003. An *Arabidopsis* callose synthase, GSL5, is required for wound and papillary callose formation. *Plant Cell.* 15(11): 2503-2513.

Jaffe MJ, Leopold AC. 1984. Callose deposition during gravitropism of *Zea mays* and *Pisum sativum* and its inhibition by 2-deoxy-D-glucose. *Planta* 161(1): 20-26.

Jang JC, Sheen J. 1994. Sugar sensing in higher plants. *The Plant Cell.* 6(11): 1665-1679.

Jauh GY, Lord EM. 1996. Localization of pectins and arabinogalactan-proteins in lily (*Lilium longiflorum* L.) pollen tube and style, and their possible roles in pollination. *Planta.* 199: 251-261.

Jensen JK, Sørensen SO, Harholt J, Geshi N, Sakuragi Y, Møller I, Zandleven J, Bernal AJ, Jensen NB, Sørensen C, Pauly M, Beldman G, Willats WG, Scheller HV. 2008. Identification of a xylogalacturonan xylosyltransferase involved in pectin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 20(5): 1289-1302.

Jensen JK, Schultink A, Keegstra K, Wilkerson CG, Pauly M. 2012. RNA-Seq analysis of developing nasturtium seeds (*Tropaeolum majus*): identification and characterization of an additional galactosyltransferase involved in xyloglucan biosynthesis. *Mol. Plant.* **5**(5): 984-992.

Jensen WA. 1962. Botanical Histochemistry – principles and practice. University of California, Berkeley. W. H. Freeman and Company.

Jiang L, Yang SL, Xie LF, Puaah CS, Zhang XQ, Yang WC, Sundaresan V, Ye D. 2005. *VANGUARD1* encodes a pectin methylesterase that enhances pollen tube growth in the *Arabidopsis* style and transmitting tract. *Plant Cell.* **17**: 584-596.

Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Haue, M, Doudna JA, Charpentier E. 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* **337**:816-821.

Johnson-Brousseau SA, McCormick S. 2004. A compendium of methods useful for characterizing *Arabidopsis* pollen mutants and gametophytically-expressed genes. *Plant J.* **39**: 761-775.

Jolie RP, Duvetter T, Van Loey AM, Hendrickx ME. 2010. Pectin methylesterase and its proteinaceous inhibitor: a review. *Carbohydr. Res.* **345**(18): 2583-2595.

✍

Kaneko S, Ishii T, Matsunaga T. 1997. A boron-rhamnogalacturonan-II complex from bamboo shoot cell walls. *Phytochem.* **44**: 243-248.

Kaschani F, Verhelst SH, van Swieten PF, Verdoes M, Wong CS, Wang Z, Kaiser M, Overkleeft HS, Bogyo M, van der Hoorn RA. 2009. Minitags for small molecules: detecting targets of reactive small molecules in living plant tissues using 'click chemistry'. *Plant J.* **57**(2): 373-385.

Keegstra K, Talmadge KW, Bauer WD, Albersheim P. 1973. The structure of plant cell walls: III. a model of the walls of suspension-cultured sycamore cells based on the interconnections of the macromolecular components. *Plant Physiol.* **51**(1): 188-197.

Kieliszewski MJ, Lamport DT. 1994. Extensin: repetitive motifs, functional sites, post-translational codes, and phylogeny. *Plant J.* **5**(2): 157-172.

Kitazawa K, Tryfona T, Yoshimi Y, Hayashi Y, Kawauchi S, Antonov L, Tanaka H, Takahashi T, Kaneko S, Dupree P, Tsumuraya Y, Kotake T. 2013. β -galactosyl Yariv reagent binds to the β -1,3-galactan of arabinogalactan proteins. *Plant Physiol.* **161**(3): 1117-1126.

Kobayashi M, Matoh T, Azuma J. 1996. Two chains of rhamnogalacturonan II are cross-linked by borate-diol ester bonds in higher plant cell walls. *Plant Physiol.* **110**: 1017-1020.

Kobayashi M, Nakagawa H, Asaka T, Matoh T. 1999. Borate-rhamnogalacturonan II bonding reinforced by Ca^{2+} retains pectic polysaccharides in higher-plant cell walls. *Plant Physiol.* **119**(1): 199-204.

Kobayashi M, Kouzu N, Inami A, Toyooka K, Konishi Y, Matsuoka K, Matoh T. 2011. Characterization of *Arabidopsis* CTP:3-deoxy-D-manno-2-octulosonate cytidyltransferase (CMP-KDO synthetase), the enzyme that activates KDO during rhamnogalacturonan II biosynthesis. *Plant Cell Physiol.* **52**: 1832-1843.

Koh EJ, Zhou L, Williams DS, Park J, Ding N, Duan YP, Kang BH. 2012. Callose deposition in the phloem plasmodesmata and inhibition of phloem transport in citrus leaves infected with "*Candidatus Liberibacter asiaticus*". *Protoplasma.* **249**(3): 687-697.

Kolb HC, Finn MG, Sharpless KB. 2001. Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **40**(11): 2004-2021.

Kunze I, Ebneith M, Heim U, Geiger M, Sonnewald U, Herbers K. 2001. 2-Deoxyglucose resistance: a novel selection marker for plant transformation. *Mol. Breeding.* **7**: 221-227.

Kuru E, Hughes HV, Brown PJ, Hall E, Tekkam S, Cava F, de Pedro MA, Brun YV, VanNieuwenhze MS. 2012. *In situ* probing of newly synthesized peptidoglycan in live bacteria with fluorescent D-amino acids. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **51**(50): 12519-12523.

Kwack BH. 1967. Studies on cellular site of calcium action in promoting pollen growth. *Physiol. Plant.* **20**: 825-833.



Lalanne E, Michaelidis C, Moore JM, Gagliano W, Johnson A, Patel R, Howden R, Vielle-Calzada JP, Grossniklaus U, Twell D. 2004. Analysis of transposon insertion mutants highlights the diversity of mechanisms underlying male progamic development in *Arabidopsis*. *Genetics.* **167**(4): 1975-1986.

Lampart DTA. 1965. Hydroxyproline-O-glycosidic linkage of the primary cell wall extensin. *Nature.* **216**: 1322-1324

Laughlin ST, Baskin JM, Amacher SL, Bertozzi CR. 2008. *In vivo* imaging of membrane-associated glycans in developing zebrafish. *Science.* **320**(5876): 664-667.

Laughlin ST, Bertozzi CR. 2009. *In vivo* imaging of *Caenorhabditis elegans* glycans. *ACS Chem. Biol.* **4**(12): 1068-1072.

Lee YJ, Szumlanski A, Nielsen E, Yang Z. 2008. Rho-GTPase-dependent filamentous actin dynamics coordinate vesicle targeting and exocytosis during tip growth. *J. Cell Biol.* **181**: 1155-1168.

Lehner A, Dardelle F, Soret-Morvan O, Lerouge P, Driouich A, Mollet JC. 2010. Pectins in the cell wall of *Arabidopsis thaliana* pollen tube and pistil. *Plant Signal. Behav.* **5**: 1282-1285.

Lerouge P, O'Neill MA, Darvill AG, Albersheim P. 1993. Structural characterization of endoglycanase-generated oligoglycosyl side chains of rhamnogalacturonan I. *Carbohydr Res.* **243**(2): 359-371.

Leroux C, Bouton S, Kiefer-Meyer MC, Fabrice TN, Mareck A, Guénin S, Fournet F, Ringli C, Pelloux J, Driouich A, Lerouge P, Lehner A, Mollet JC. 2015. PECTIN METHYLESTERASE48 is involved in *Arabidopsis* pollen grain germination. *Plant Physiol.* **167**(2): 367-380.

Levy I, Shani Z, Shoseyov O. 2002. Modification of polysaccharides and plant cell wall by endo-1,4-beta-glucanase and cellulose-binding domains. *Biomol. Eng.* **19**(1): 17-30.

Li C, Pfeffer H, Dannel F, Römheld V, Bangerth F. 2001. Effects of boron starvation on boron compartmentation, and possibly hormone-mediated elongation growth and apical dominance of pea (*Pisum sativum*) plants. *Physiol Plant.* **111**(2): 212-219.

Li C, Guan Z, Liu D, Raetz CR. 2011. Pathway for lipid A biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* resembling that of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **108**(28): 11387-11392.

Li S, Bashline L, Lei L, Gu Y. 2014. Cellulose synthesis and its regulation. In *The Arabidopsis book*. **12**:e0169 10.1199.

- Li SW, Xue L, Xu S, Feng H, An L. 2009.** Mediators, genes and signaling in adventitious rooting. *Bot. Rev.* 75: 230-247
- Li YQ, Chen F, Linskens HF, Cresti M. 1994.** Distribution of unesterified and esterified pectins in cell-walls of pollen tubes of flowering plants. *Sexual Plant Reprod.* 7(3): 145-152.
- Liang Y, Basu D, Pattathil S, Xu W, Venetos A, Martin SL, Faik A, Hahn MG, Showalter AM. 2013.** Biochemical and physiological characterization of *fut4* and *fut6* mutants defective in arabinogalactan-protein fucosylation in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 64: 5537-5551.
- Liners F, Letesson JJ, Didembourg C, Van Cutsem P. 1989.** Monoclonal antibodies against pectin: recognition of a conformation induced by calcium. *Plant Physiol.* 91(4): 1419-1424.
- Link AJ, Tirrell DA. 2003.** Cell surface labeling of *Escherichia coli* via copper(I)-catalyzed [3+2] cycloaddition. *J. Am. Chem. Soc.* 125(37): 11164-11165.
- Link AJ, Vink MK, Tirrell DA. 2004.** Presentation and detection of azide functionality in bacterial cell surface proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 126(34): 10598-10602.
- Liu XL, Liu L, Niu QK, Xia C, Yang KZ, Li R, Chen LQ, Zhang XQ, Zhou Y, Ye D. 2011.** *MALE GAMETOPHYTE DEFECTIVE 4* encodes a rhamnogalacturonan II xylosyltransferase and is important for growth of pollen tubes and roots in *Arabidopsis*. *Plant J.* 65: 647-660.
- Liwanag AJ, Ebert B, Verhertbruggen Y, Rennie EA, Rautengarten C, Oikawa A, Andersen MC, Clausen MH, Scheller HV. 2012.** Pectin biosynthesis: GAL51 in *Arabidopsis thaliana* is a β -1,4-galactan β -1,4-galactosyltransferase. *Plant Cell.* 24(12): 5024-5036.
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. 2000.** Molecular cell biology. 4th edition. New York: Freeman WH. *The dynamic plant cell wall*. Section 22.5.
- López-Bucio J, Cruz-Ramírez A, Herrera-Estrella L. 2003.** The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 6(3): 280-287.
- Loopstra CA, Sederoff RR. 1995.** Xylem-specific gene expression in loblolly pine. *Plant Mol. Biol.* 27(2): 277-291.
- Loraine AE, McCormick S, Estrada A, Patel K, Qin P. 2013.** RNA-Seq of *Arabidopsis* pollen uncovers novel transcription and alternative splicing. *Plant Physiol.* 162: 1092-1109.
- Louvet R, Cavel E, Gutierrez L, Guénin S, Roger D, Gillet F, Guerineau F, Pelloux J. 2006.** Comprehensive expression profiling of the pectin methylesterase gene family during silique development in *Arabidopsis thaliana*. *Planta.* 224(4): 782-791.
- Luna E, Pastor V, Robert J, Flors V, Mauch-Mani B, Ton J. 2011.** Callose deposition: a multifaceted plant defense response. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 24(2): 183-193.



- Ma X, Zhang Q, Zhu Q, Liu W, Chen Y, Qiu R, Wang B, Yang Z, Li H, Lin Y, Xie Y, Shen R, Chen S, Wang Z, Chen Y, Guo J, Chen L, Zhao X, Dong Z, Liu YG. 2015.** A robustCRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicotplants. *Mol Plant*. doi: 10.1016.
- Madson M, Dunand C, Li X, Verma R, Vanzin GF, Caplan J, Shoue DA, Carpita NC, Reiter WD. 2003.** The *MUR3* gene of *Arabidopsis* encodes a xyloglucan galactosyltransferase that is evolutionarily related to animal exostosins. *Plant Cell*. **15**(7): 1662-1670.
- Mangeon A, Junqueira RM, Sachetto-Martins G. 2010.** Functional diversity of the plant glycine-rich proteins superfamily. *Plant Signal. Behav.* **5**(2): 99-104.
- Martín-Rejano EM, Camacho-Cristóbal JJ, Herrera-Rodríguez MB, Rexach J, Navarro-Gochicoa MT, González-Fontes A. 2011.** Auxin and ethylene are involved in the responses of root system architecture to low boron supply in *Arabidopsis* seedlings. *Physiol Plant*. **142**(2): 170-178.
- Mas Pons J, Dumont A, Sautejeau G, Fugier E, Baron A, Dukan S, Vauzeilles B. 2014.** Identification of living *Legionella pneumophila* using species-specific metabolic lipopolysaccharide labeling. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **53**(5): 1275-1278.
- Matoh T, Ishigaki K, Ohno K, Azuma J. 1993.** Isolation and characterization of a boron-polysaccharide complex from radish roots. *Plant Cell Physiol*. **34**: 639-642.
- Matoh T, Takasaki M, Takabe K, Kobayashi M. 1998.** Immunocytochemistry of rhamnogalacturonan II in cell walls of higher plants. *Plant Cell Physiol*. **39**: 483-491.
- Matsunaga T, Ishii T, Matsumoto S, Higuchi M, Darvill A, Albersheim P, O'Neill MA. 2004.** Occurrence of the primary cell wall polysaccharide rhamnogalacturonan II in pteridophytes, lycophytes, and bryophytes. Implications for the evolution of vascular plants. *Plant Physiol*. **134**: 339-351.
- Matsunaga T, Ishii T. 2006.** Borate cross-linked/total rhamnogalacturonan II ratio in cell walls for the biochemical diagnosis of boron deficiency in hydroponically grown pumpkin. *Anal. Sci.* **22**(8): 1125-1127.
- Matsuura K, Miyagawa I, Kobayashi M, Ohta D, Matoh T. 2003.** *Arabidopsis* 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulose-8-phosphate synthase: cDNA cloning and expression analyses. *J. Exp. Bot.* **54**(388): 1785-1787.
- McCarthy TW, Der JP, Honaas LA, de Pamphilis CW, Anderson CT. 2014.** Phylogenetic analysis of pectin-related gene families in *Physcomitrella patens* and nine other plant species yields evolutionary insights into cell walls. *BMC Plant Biol.* **14**: 79.
- McDougall AJ, Needs PW, Rigby N, Ring SG. 1996.** Calcium gelation of pectic polysaccharides isolated from unripe tomato fruit. *Carbohydr. Res.* **293**(2): 235-249.
- McKenna ST, Kunkel JG, Bosch M, Rounds CM, Vidali L, Winship LJ, Hepler PK. 2009.** Exocytosis precedes and predicts the increase in growth in oscillating pollen tubes. *Plant Cell*. **21**: 3026-3040.
- McNeil M, Alan G, Darvill AG, Fry SC, Albersheim P. 1984.** Structure and function of the primary cell walls of plants. *Ann. Rev. Biochem.* **53**: 625-663.

McQueen-Mason S, Durachko DM, Cosgrove DJ. 1992. Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. *Plant Cell*. **4**(11): 1425-1433.

Miao Y, Li HY, Shen J, Wang J, Jiang L. 2011. QUASIMODO 3 (QUA3) is a putative homogalacturonan methyltransferase regulating cell wall biosynthesis in *Arabidopsis* suspension-cultured cells. *J. Exp. Bot.* **62**(14): 5063-5078.

Miwa K, Wakuta S, Takada S, Ide K, Takano J, Naito S, Omori H, Matsunaga T, Fujiwara T. 2013. Roles of BOR2, a boron exporter, in cross linking of rhamnogalacturonan II and root elongation under boron limitation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **163**(4): 1699-1709.

Mohnen D. 2002. Biosynthesis of pectins. In (eds): Seymour GB, Knox JP, *Pectins: Structure, Function and Manipulation*, Blackwell Publishing, 52-98.

Mohnen D. 2008. Pectin structure and biosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* **11**: 266-277.

Mølhøj M, Verma R, Reiter W. 2003. The biosynthesis of the branched-chain sugar D-apiose in plants: functional cloning and characterization of a UDP-D-apiose/UDP-D-xylose synthase from *Arabidopsis*. *Plant J.* **35**: 693-703.

Mollet JC, Kim S, Jauh GY, Lord EM. 2002. Arabinogalactan proteins, pollen tube growth, and the reversible effects of Yariv phenylglycoside. *Protoplasma.* **219**(1-2): 89-98.

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

Morris G, Ralet MC. 2012. A copolymer analysis approach to estimate the neutral sugar distribution of sugar beet pectin using size exclusion chromatography. *Carbohydr. Polym.* **87**(2): 1139-1143.

Mouille G, Ralet MC, Cavelier C, Eland C, Effroy D, Hématy K, McCartney L, Truong HN, Gaudon V, Thibault JF, Marchant A, Höfte H. 2007. Homogalacturonan synthesis in *Arabidopsis thaliana* requires a Golgi-localized protein with a putative methyltransferase domain. *Plant J.* **50**(4): 605-614.

Mravec J, Kračun SK, Rydahl MG, Westereng B, Miart F, Clausen MH, Fangel JU, Daugaard M, Van Cutsem P, De Fine Licht HH, Höfte H, Malinovsky FG, Domozych DS, Willats WG. 2014. Tracking developmentally regulated post-synthetic processing of homogalacturonan and chitin using reciprocal oligosaccharide probes. *Development.* **141**(24): 4841-4850.

Mueller SC, Brown RM Jr. 1980. Evidence for an intramembrane component associated with a cellulose microfibril-synthesizing complex in higher plants. *J. Cell. Biol.* **84**: 315-332

Mutwil M, Debolt S, Persson S. 2008. Cellulose synthesis: a complex complex. *Curr. Opin. Plant Biol.* **11**(3): 252-257.

n

Neves AA, Stöckmann H, Wainman YA, Kuo JC, Fawcett S, Leeper FJ, Brindle KM. 2013. Imaging cell surface glycosylation *in vivo* using "double click" chemistry. *Bioconjug. Chem.* **24**(6): 934-941.

Nezames CD, Sjogren CA, Barajas JF, Larsen PB. 2012. The *Arabidopsis* cell cycle checkpoint regulators TANMEI/ALT2 and ATR mediate the active process of aluminum-dependent root growth inhibition. *Plant Cell.* **24**(2):608-621.

Nguema-Ona E, Coimbra S, Vicré-Gibouin M, Mollet JC, Driouich A. 2012. Arabinogalactan proteins in root and pollen-tube cells: distribution and functional aspects. *Ann. Bot.* **110**(2): 383-404.

Nguema-Ona E, Vicré-Gibouin M, Cannesan MA, Driouich A. 2013. Arabinogalactan proteins in root-microbe interactions. *Trends Plant Sci.* **18**(8): 440-449.

Nguema-Ona E, Vicré-Gibouin M, Gotté M, Plancot B, Lerouge P, Bardor M, Driouich A. 2014. Cell wall O-glycoproteins and N-glycoproteins: aspects of biosynthesis and function. *Front. Plant. Sci.* **5**:499.

Nishitani K, Vissenberg K. 2007. Roles of the XTH protein family in the expanding cell. *Plant Cell. Monographs.* **5**: 89-116.

Noguchi K, Yasumori M, Imai T, Naito S, Matsunaga T, Oda H, Hayashi H, Chino M, Fujiwara T. 1997. *bor1-1*, an *Arabidopsis thaliana* mutant that requires a high level of boron. *Plant Physiol.* **115**: 901-906.

Norambuena L, Marchant L, Berninsone P, Hirschberg CB, Silva H, Orellana A. 2002. Transport of UDP-galactose in plants. Identification and functional characterization of AtUTr1, an *Arabidopsis thaliana* UDP-galactose/UDP-glucose transporter. *J. Biol. Chem.* **277**(36): 32923-32929.

Norambuena L, Nilo R, Handford M, Reyes F, Marchant L, Meisel L, Orellana A. 2005. AtUTr2 is an *Arabidopsis thaliana* nucleotide sugar transporter located in the Golgi apparatus capable of transporting UDP-galactose. *Planta.* **222**(3): 521-529.

Nour-Eldin HH, Hansen BG, Nørholm MH, Jensen JK, Halkier BA. 2006. Advancing uracil-excision based cloning towards an ideal technique for cloning PCR fragments. *Nucleic Acids Res.* **34**(18): e122.

Nour-Eldin HH, Geu-Flores F, Halkier BA. 2010. USER cloning and USER fusion: the ideal cloning techniques for small and big laboratories. *Methods Mol. Biol.* **643**: 185-200.



O'Neill MA, Albersheim P, Darvill AG. 1990. The pectic polysaccharides of primary cell walls. *Methods Plant Biochem.* **2**: 415-451.

O'Neill MA, Warrenfeltz D, Kates K, Pellerin P, Doco T, Darvill AG, Albersheim P. 1996. Rhamnogalacturonan-II, a pectic polysaccharide in the walls of growing plant cell, forms a dimer that is covalently cross-linked by a borate ester. *In vitro* conditions for the formation and hydrolysis of the dimer. *J. Biol. Chem.* **271**: 22923-22930.

O'Neill 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.

O'Neill MA, Ishii T, Albersheim P, Darvill AG. 2004. Rhamnogalacturonan II: structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**: 109-139.

Orfila C, Sørensen SO, Harholt J, Geshi N, Crombie H, Truong HN, Reid JS, Knox JP, Scheller HV. 2005. *QUASIMODO1* is expressed in vascular tissue of *Arabidopsis thaliana* inflorescence stems, and affects homogalacturonan and xylan biosynthesis. *Planta.* **222**(4): 613-622.

Overvoorde P, Fukaki H, Beeckman T. 2010. Auxin control of root development. *Cold. Spring. Harb. Perspect. Biol.* **2**(6): a001537.



- Pabst M, Fischl RM, Brecker L, Morelle W, Fauland A, Köfeler H, Altmann F, Léonard R. 2013.** Rhamnogalacturonan II structure shows variation in the side chains monosaccharide composition and methylation status within and across different plant species. *Plant J.* **76**: 61-72
- Park YB, Cosgrove DJ. 2012a.** A revised architecture of primary cell walls based on biomechanical changes induced by substrate-specific endoglucanases. *Plant Physiol.* **158**(4): 1933-1943.
- Park YB, Cosgrove DJ. 2012b.** Changes in cell wall biomechanical properties in the xyloglucan-deficient *xxt1/xxt2* mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **158**(1): 465-475.
- Parre E, Geitmann A. 2005.** More than a leak sealant. The mechanical properties of callose in pollen tubes. *Plant Physiol.* **137**: 274-286.
- Pauly M, Gille S, Liu L, Mansoori N, de Souza A, Schultink A, Xiong G. 2013.** Hemicellulose biosynthesis. *Planta.* **238**(4): 627-642.
- Payasi A, Sanwal R, Sanwal GG. 2008.** Microbial pectate lyases: characterization and enzymological properties. *World J. Microb. Biot.* **25**(1): 1-14.
- Pellerin P, Doco T, Vidal S, Williams P, Brillouet JM, O'Neill MA. 1996.** Structural characterization of red wine rhamnogalacturonan II. *Carbohydr. Res.* **290**: 183-197.
- Pellerin P, O'Neill MA. 1998.** The interaction of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II with heavy metals and lanthanides in wines and fruit juices. *Analisis* **26** (6): 32-36.
- Pelloux J, Rustérucchi, Mellerowicz EJ. 2007.** New insights into pectin methylesterase structure and function. *Trends Plant Sci.* **12** (6): 267-277.
- Peña MJ, Kong Y, York WS, O'Neill MA. 2012.** A galacturonic acid-containing xyloglucan is involved in *Arabidopsis* root hair tip growth. *Plant Cell.* **24**(11): 4511-24.
- Pereira LG, Coimbra S, Oliveira H, Monteiro L, Sottomayor M. 2006.** Expression of arabinogalactan protein genes in pollen tubes of *Arabidopsis thaliana*. *Planta.* **223**(2): 374-380.
- Péret B, De Rybel B, Casimiro I, Benková E, Swarup R, Laplaze L, Beeckman T, Bennett MJ. 2009.** *Arabidopsis* lateral root development: an emerging story. *Trends Plant Sci.* **14**(7): 399-408.
- Pérez S, Rodríguez-Carvajal MA, Doco T. 2003.** A complex plant cell wall polysaccharide: rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function. *Biochimie.* **85**: 109-121.
- Perrin RM, DeRocher AE, Bar-Peled M, Zeng W, Norambuena L, Orellana A, Raikhel NV, Keegstra K. 1999.** Xyloglucan fucosyltransferase, an enzyme involved in plant cell wall biosynthesis. *Science.* **284**(5422): 1976-1979.
- Petersen BL, Egelund J, Damager I, Faber K, Jensen JK, Yang Z, Bennett EP, Scheller HV, Ulvskov P. 2009.** Assay and heterologous expression in *Pichia pastoris* of plant cell wall type-II membrane anchored glycosyltransferases. *Glycoconj. J.* **26**(9): 1235-1246.
- Petricka JJ, Winter CM, Benfey PN. 2012.** Control of *Arabidopsis* root development. *Annu. Rev. Plant. Biol.* **63**: 563-590.

Pina C, Pinto F, Feijó JA, Becker JD. 2005. Gene family analysis of the *Arabidopsis* pollen transcriptome reveals biological implications for cell growth, division control, and gene expression regulation. *Plant Physiol.* **138**: 744-756.

Plancot B, Santaella C, Jaber R, Kiefer-Meyer MC, Follet-Gueye ML, Leprince J, Gattin I, Souc C, Driouich A, Vitré-Gibouin M. 2013. Deciphering the responses of root border-like cells of *Arabidopsis* and flax to pathogen-derived elicitors. *Plant Physiol.* **163**(4): 1584-1597.

Popper ZA, Fry SC. 2005. Widespread occurrence of a covalent linkage between xyloglucan and acidic polysaccharides in suspension-cultured angiosperm cells. *Ann Bot.* **96**(1): 91-99.

Popper ZA, Fry SC. 2008. Xyloglucan-pectin linkages are formed intra-protoplasmically, contribute to wall-assembly, and remain stable in the cell wall. *Planta.* **227**(4): 781-794.

Prescher JA, Dube DH, Bertozzi CR. 2004. Chemical remodelling of cell surfaces in living animals. *Nature.* **430**: 873-877.

Prescher JA, Bertozzi CR. 2005. Chemistry in living systems. *Nature Chem. Biol.* **1**: 13-21.

2

Qin P, Ting D, Shieh A, McCormick S. 2012. Callose plug deposition patterns vary in pollen tubes of *Arabidopsis thaliana* ecotypes and tomato species. *BMC Plant Biol.* **12**: 178.

R

Ralet MC, Crépeau MJ, Buchholt HC, Thibault JF. 2003. Polyelectrolyte behavior and calcium binding properties of sugar beet pectins differing in their degrees of methylation and acetylation. *Biochem. Eng. J.* **16**: 191-201.

Rautengarten C, Ebert B, Moreno I, Temple H, Herter T, Link B, Doñas-Cofré D, Moreno A, Saéz-Aguayo S, Blanco F, Mortimer JC, Schultink A, Reiter WD, Dupree P, Pauly M, Heazlewood JL, Scheller HV, Orellana A. 2014. The Golgi localized bifunctional UDP-rhamnose/UDP-galactose transporter family of *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **111**(31): 11563-11568.

Reiter WD. 2008. Biochemical genetics of nucleotide sugar interconversion reactions. *Curr. Opin. Plant. Biol.* **11**(3): 236-243.

Reuhs, BL, Glenn J., Stephens SB, Kim JS, Christie DB, Glushka JG, Zablackis E, Albersheim P, Darvill A, O'Neill MA. 2004. L-galactose replaces L-fucose in the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II synthesized by the L-fucose deficient *mur1 Arabidopsis mutant*. *Planta.* **219**: 147-157.

Rhee SY, Somerville CR. 1998. Tetrad pollen formation in *quartet* mutants of *Arabidopsis thaliana* is associated with persistence of pectic polysaccharides of the pollen mother cell wall. *Plant J.* **15**: 79-88.

Richmond TA, Somerville CR. 2000. The cellulose synthase superfamily. *Plant Physiol.* **124**: 495-498.

Ridley BL, O'Neill MA, Mohnen D. 2001. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochem.* **57**(6): 929-967.

Rillahan CD, Antonopoulos A, Lefort CT, Sonon R, Azadi P, Ley K, Dell A, Haslam SM, Paulson JC. 2012. Global metabolic inhibitors of sialyl- and fucosyltransferases remodel the glycome. *Nat. Chem. Biol.* **8**(7): 661-668.

Rodríguez-Carvajal MA, Hervé du Penhoat C, Mazeau K, Doco T, Pérez S. 2003. The three-dimensional structure of the mega-oligosaccharide rhamnogalacturonan II monomer: a combined molecular modeling and NMR investigation. *Carbohydr. Res.* **338**(7): 651-671.

Rollwitz I, Santaella M, Hille D, Flügge UI, Fischer K. 2006. Characterization of AtNST-KT1, a novel UDP-galactose transporter from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* (17): 4246-4251.

Rose JK, Bennett AB. 1999. Cooperative disassembly of the cellulose-xyloglucan network of plant cell walls: parallels between cell expansion and fruit ripening. *Trends Plant Sci.* **4**(5): 176-183.

Rose JK, Braam J, Fry SC, Nishitani K. 2002. The XTH family of enzymes involved in xyloglucan endotransglucosylation and endohydrolysis: current perspectives and a new unifying nomenclature. *Plant Cell Physiol.* **43**(12): 1421-1435.

Rostovtsev VV, Green LG, Fokin VV, Sharpless KB. 2002. A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **41**(14): 2596-2599.

Royo J, Gómez E, Hueros G. 2000a. A maize homologue of the bacterial CMP-3-deoxy-D-manno-2-octulosonate (KDO) synthetases. Similar pathways operate in plants and bacteria for the activation of KDO prior to its incorporation into outer cellular envelopes. *J. Biol. Chem.* **275**(32): 24993-24999.

Royo J, Gómez E, Hueros G. 2000b. CMP-KDO synthetase: a plant gene borrowed from gram-negative eubacteria. *Trends Genet.* **16**(10): 432-433.

Rubinstein AL, Broadwater AH, Lowrey KB, Bedinger PA. 1995. *PEX1*, a pollen-specific gene with an extensin-like domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **92**(8): 3086-3090.

Ryden P, Sugimoto-Shirasu K, Smith AC, Findlay K, Reiter WD, McCann MC. 2003. Tensile properties of *Arabidopsis* cell walls depend on both a xyloglucan cross-linked microfibrillar network and rhamnogalacturonan II-borate complexes. *Plant Physiol.* **132**(2): 1033-1040.

S

Sachetto-Martins G, Franco LO, de Oliveira DE. 2000. Plant glycine-rich proteins: a family or just proteins with a common motif? *Biochim. Biophys. Acta.* **1492**(1): 1-14.

Sampedro J, Cosgrove DJ. 2005. The expansin superfamily. *Genome Biol.* **6**(12): 242.

Samuels AL, Giddings TH, Staehelin LA, 1995. Cytokinesis in tobacco BY-2 and root tip cells: A new model of cell plate formation in higher plants. *J. Cell Biol.* **130**: 1345-1357.

Sawa M, Hsu TL, Itoh T, Sugiyama M, Hanson SR, Vogt PK, Wong CH. 2006. Glycoproteomic probes for fluorescent imaging of fucosylated glycans *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **103**(33): 12371-12376.

Scheller HV, Ulvskov P. 2010. Hemicelluloses. *Annu. Rev. Plant Biol.* **61**: 263-289.

Schultink A, Liu L, Zhu L, Pauly M. 2014. Structural diversity and function of xyloglucan sidechain substituents. *Plants.* **3**(4): 526-542.

- Seifert GJ, Roberts K. 2007.** The biology of arabinogalactan proteins. *Annu. Rev. Plant Biol.* **58**: 137-161.
- Sénéchal F, Wattier C, Rustérucci C, Pelloux J. 2014.** Homogalacturonan-modifying enzymes: structure, expression, and roles in plants. *J. Exp. Bot.* **65**(18): 5125-5160.
- Séveno M, Bardor M, Paccalet T, Gomord V, Lerouge P, Faye L. 2004.** Glycoprotein sialylation in plants? *Nat. Biotechnol.* **22**: 1351-1352.
- Séveno M, Séveno-Carpentier E, Voxeur A, Menu-Bouaouiche L, Rihouey C, Delmas F, Chevalier C, Driouich A, Lerouge P. 2010.** Characterization of a putative 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid (Kdo) transferase gene from *Arabidopsis thaliana*. *Glycobiology.* **20**(5): 617-628.
- Sherrier DJ, Taylor GS, Silverstein KA, Gonzales MB, VandenBosch KA. 2005.** Accumulation of extracellular proteins bearing unique proline-rich motifs in intercellular spaces of the legume nodule parenchyma. *Protoplasma.* **225**(1-2): 43-55.
- Shimokawa T, Ishii T, Matsunaga T. 1999.** Isolation and structural characterization of rhamnogalacturonan II-borate complex from *Pinus densiflora*. *J. Wood Sci.* **45**: 435-439.
- Showalter AM. 1993.** Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell.* **5**(1): 9-23.
- Smyth KM, Marchant A. 2013.** Conservation of the 2-keto-3-deoxymanno-octulosonic acid (Kdo) biosynthesis pathway between plants and bacteria. *Carbohydr. Res.* **380**: 70-75.
- Smyth KM, Mikolajek H, Werner JM, Marchant A. 2013.** 2 β -deoxy-Kdo is an inhibitor of the *Arabidopsis thaliana* CMP-2-Keto-3-deoxymanno-octulosonic acid synthetase, the enzyme required for activation of Kdo prior to incorporation into rhamnogalacturonan II. *Mol. Plant.* **6**(3): 981-984.
- Somerville C. 2007.** Biofuels. *Curr. Biol.* **17**: 115-119.
- Sommer-Knudsen J, Bacic A, Clarke E. 1998.** Hydroxyproline-rich plant glycoproteins. *Phytochem.* **47**(4): 483-497.
- Speers AE, Cravatt BF. 2004.** Profiling enzyme activities *in vivo* using click chemistry methods. *Chem Biol.* **11**(4): 535-546.
- Stepanova AN, Yun J, Likhacheva AV, Alonso JM. 2007.** Multilevel interactions between ethylene and auxin in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell.* **19**(7):2169-2185.
- Sterling JD, Atmodjo MA, Inwood SE, Kumar Kolli VS, Quigley HF, Hahn MG, Mohnen D. 2006.** Functional identification of an *Arabidopsis* pectin biosynthetic homogalacturonan galacturonosyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **103**(13): 5236-5241.
- Sticklen MB. 2008.** Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. *Nat. Rev. Genet.* **9**(6): 433-443.
- Sugimoto K, Williamson RE, Wasteneys GO. 2001.** Wall architecture in the cellulose-deficient *rsw1* mutant of *Arabidopsis thaliana*: microfibrils but not microtubules lose their transverse alignment before microfibrils become unrecognizable in the mitotic and elongation zones of roots. *Protoplasma.* **215**(1-4): 172-183.

Tanaka M, Wallace IS, Takano J, Roberts DM, Fujiwara T. 2008. NIP6;1 is a boric acid channel for preferential transport of boron to growing shoot tissues in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20, 2860-2875.

Takano J, Yamagami M, Noguchi K, Hayashi H, Fujiwara T. 2001. Preferential translocation of boron to young leaves in *Arabidopsis thaliana* regulated by the *BOR1* gene. *Soil Sci. Plant Nutr.* 47(2): 345-357.

Takano J, Wada M, Ludewig U, Schaaf G, von Wirén N, Fujiwara T. 2006. The *Arabidopsis* major intrinsic protein NIP5;1 is essential for efficient boron uptake and plant development under boron limitation. *Plant Cell.* 18(6): 1498-1509.

Takashima S, Seino J, Nakano T, Fujiyama K, Tsujimoto M, Ishida N, Hashimoto Y. 2009. Analysis of CMP-sialic acid transporter-like proteins in plants. *Phytochem.* 70: 1973-1981.

Thompson JE, Fry SC. 2000. Evidence for covalent linkage between xyloglucan and acidic pectins in suspension-cultured rose cells. *Planta.* 211(2): 275-286.

Thompson JE, Fry SC. 2001. Restructuring of wall-bound xyloglucan by transglycosylation in living plant cells. *Plant J.* 26(1): 23-34.

Tian GW, Chen MH, Zaltsman A, Citovsky V. 2006. Pollen-specific pectin methylesterase involved in pollen tube growth. *Dev. Biol.* 294: 83-91.

Tobimatsu Y, Van de Wouwer D, Allen E, Kumpf R, Vanholme B, Boerjan W, Ralph J. 2014. A click chemistry strategy for visualization of plant cell wall lignification. *Chem. Commun.* 50: 12262-12265.

Tornøe CW, Christensen C, Meldal M. 2002. Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regioselective copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *J. Org. Chem.* 67: 3057-3064.

U

Ulmasov T, Murfett J, Hagen G, Guilfoyle TJ. 1997. Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell.* 9(11): 1963-1971.

V

Valent BS, Albersheim P. 1974. The structure of plant cell walls: V. On the binding of xyloglucan to cellulose fibers. *Plant Physiol.* 54(1): 105-108.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3(7): research0034.

Van Hengel AJ, Van Kammen A, De Vries SC. 2002. A relationship between seed development, Arabinogalactan-proteins (AGPs) and the AGP mediated promotion of somatic embryogenesis. *Physiol. Plant.* 114(4): 637-644.

Vanzin GF, Madson M, Carpita NC, Raikhel NV, Keegstra K, Reiter WD. 2002. The *mur2* mutant of *Arabidopsis thaliana* lacks fucosylated xyloglucan because of a lesion in fucosyltransferase AtFUT1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 99(5): 3340-3345.

- Verma DPS, Hong Z. 2001.** Plant callose synthase complexes. *Plant Mol. Biol.* **47**: 693-701.
- Verstraeten I, Schotte S, Geelen D. 2014.** Hypocotyl adventitious root organogenesis differs from lateral root development. *Front. Plant. Sci.* **5**: 495.
- Vidal S, Doco T, Williams P, Pellerin P, York WS, O'Neill MA, Glushka J, Darvill AG, Albersheim P. 2000.** Structural characterization of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II: evidence for the backbone location of the aceric acid-containing oligoglycosyl side chain. *Carbohydr. Res.* **326**: 277-294.
- Vincken JP, Schols HA, Oomen RJ, McCann MC, Ulvskov P, Voragen AG, Visser RG. 2003.** If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. *Plant Physiol.* **132**(4): 1781-1789.
- von Schaewen A, Sturm A, O'Neill J, Chrispeels MJ. 1993.** Isolation of a mutant *Arabidopsis* plant that lacks *N*-acetyl glucosaminyl transferase I and is unable to synthesize Golgi-modified complex *N*-linked glycans. *Plant Physiol.* **102**(4):1109-1118.
- Voragen AG, Coenen GJ, Verhoef RP, Schols HA. 2009.** Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Struct. Chem.* **20**(2): 263-275.
- Voxeur A, Gilbert L, Rihouey C, Driouich A, Rothan C, Baldet P, Lerouge P. 2011.** Silencing of the GDP-D-mannose 3,5-epimerase affects the structure and cross-linking of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II and plant growth in tomato. *J. Biol. Chem.* **286**: 8014-8020.
- Voxeur A, André A, Breton C, Lerouge P. 2012.** Identification of putative rhamnogalacturonan-II specific glycosyltransferases in *Arabidopsis* using a combination of bioinformatics approaches. *PLoS one.* **7**: e51129.
- Voxeur A, Fry SC. 2014.** Glycosylinositol phosphorylceramides from *Rosa* cell cultures are boron-bridged in the plasma membrane and form complexes with rhamnogalacturonan II. *Plant J.* **79**(1): 139-149.
- Vuttipongchaikij S, Brocklehurst D, Steele-King C, Ashford DA, Gomez LD, McQueen-Mason SJ. 2012.** *Arabidopsis* GT34 family contains five xyloglucan α -1,6-xylosyltransferases. *New Phytol.* **195**(3): 585-595.

W

- Wallace IS, Anderson CT. 2012.** Small molecule probes for plant cell wall polysaccharide imaging. *Front. Plant Sci.* **3**: 89.
- Wang Q, Lu L, Wu X, Li Y, Lin J. 2003.** Boron influences pollen germination and pollen tube growth in *Picea meyeri*. *Tree Physiol.* **23**: 345-351.
- Wang T, Zabolina O, Hong M. 2012.** Pectin-cellulose interactions in the *Arabidopsis* primary cell wall from two-dimensional magic-angle-spinning solid-state nuclear magnetic resonance. *Biochemistry.* **51**(49): 9846-9856.
- Wang Y, Zhang WZ, Song LF, Zou JJ, Su Z, Wu WH. 2008.** Transcriptome analyses show changes in gene expression to accompany pollen germination and tube growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **148**(3): 1201-1211.
- Warrington K. 1923.** The effect of boric acid and borax on the broad bean and certain other plants. *Ann. Bot.* **37**: 629-672.

Whitcombe AJ, O'Neill MA, Steffan W, Albersheim P, Darvill AG. 1995. Structural characterization of the pectic polysaccharide, rhamnogalacturonan-II. *Carbohydr. Res.* **271**: 15-29.

Wieczorek K, Hofmann J, Blöchl A, Szakasits D, Bohlmann H, Grundler FM. 2008. *Arabidopsis* endo-1,4-beta-glucanases are involved in the formation of root syncytia induced by *Heterodera schachtii*. *Plant J.* **53**(2): 336-351.

Williams MN, Freshour G, Darvill AG, Albersheim P, Hahn MG. 1996. An antibody Fab selected from a recombinant phage display library detects deesterified pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II in plant cells. *Plant Cell.* **8**(4): 673-685.

Wimmer MA, Lochnit G, Bassil E, Mühling KH, Goldbach HE. 2009. Membrane-associated, boron-interacting proteins isolated by boronate affinity chromatography. *Plant Cell. Physiol.* **50**(7): 1292-304.

Wolucka BA, Van Montagu M. 2007. The VTC2 cycle and the *de novo* biosynthesis pathways for vitamin C in plants: an opinion. *Phytochem.* **68**(21): 2602-2613.

Wu AM, Rihouey C, Seveno M, Hörnblad E, Singh SK, Matsunaga T, Ishii T, Lerouge P, Marchant A. 2009. The *Arabidopsis* IRX10 and IRX10-LIKE glycosyltransferases are critical for glucuronoxylan biosynthesis during secondary cell wall formation. *Plant J.* **57**(4): 718-731.

Wu J, Patel MA, Sundaram AK, Woodard RW. 2004. Functional and biochemical characterization of a recombinant *Arabidopsis thaliana* 3-deoxy-D-manno-octulosonate 8-phosphate synthase. *Biochem J.* **381**(1): 185-193.

Wu JZ, Lin Y, Zhang XL, Pang DW, Zhao J. 2008. IAA stimulates pollen tube growth and mediates the modification of its wall composition and structure in *Torenia fournieri*. *J. Exp. Bot.* **59**: 2529-2543.

Wu S, Baskin TI, Gallagher KL. 2012. Mechanical fixation techniques for processing and orienting delicate samples, such as the root of *Arabidopsis thaliana*, for light or electron microscopy. *Nat Protoc.* **7**(6): 1113-1124.

X

Xiao C, Somerville C, Anderson CT. 2014. Polygalacturonase involved in expansion functions in cell elongation and flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **26**(3): 1018-1035.

Xie D, Ma L, Samaj J, Xu C. 2011. Immunohistochemical analysis of cell wall hydroxyproline-rich glycoproteins in the roots of resistant and susceptible wax gourd cultivars in response to *Fusarium oxysporum* f. sp. *Benincasae* infection and fusaric acid treatment. *Plant Cell Rep.* **30**(8): 1555-1569.

Xu C, Takáč T, Burbach C, Menzel D, Samaj J. 2011. Developmental localization and the role of hydroxyproline rich glycoproteins during somatic embryogenesis of banana (*Musa* spp. AAA). *BMC Plant Biol.* **11**: 38.

Y

Yapo BM. 2011. Pectin Rhamnogalacturonan II: on the “small stem with four branches” in the primary cell walls of plants. *Int. J. Carbohydr. Chem.* **2011**: 1-11.

Yariv J, Lis H, Katchalski E. 1967. Precipitation of arabic acid and some seed polysaccharides by glycosylphenylazo dyes. *Biochem J.* **105**(1): 1C-2C.

Yin Y, Huang J, Gu X, Bar-Peled M, Xu Y. 2011. Evolution of plant nucleotide-sugar interconversion enzymes. *PLoS One.* (11):e27995.



Zabotina OA, van de Ven WT, Freshour G, Drakakaki G, Cavalier D, Mouille G, Hahn MG, Keegstra K, Raikhel NV. 2008. *Arabidopsis* *XXT5* gene encodes a putative alpha-1,6-xylosyltransferase that is involved in xyloglucan biosynthesis. *Plant J.* **56**(1): 101-115.

Zandleven J, Sørensen SO, Harholt J, Beldman G, Schols HA, Scheller HV, Voragen AJ. 2007. Xylogalacturonan exists in cell walls from various tissues of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochem.* **68**(8): 1219-1226.

Zeleny R, Kolarich D, Strasser R, Altmann F. 2006. Sialic acid concentrations in plants are in the range of inadvertent contamination. *Planta.* **224**: 222-227.

Zeng D, Zeglis BM, Lewis JS, Anderson CJ. 2013. The growing impact of bioorthogonal click chemistry on the development of radiopharmaceuticals. *J. Nucl. Med.* **54**(6): 829-832.

Zhong R, Ye ZH. 2015. Secondary cell walls: biosynthesis, patterned deposition and transcriptional regulation. *Plant Cell Physiol.* **6**(2): 195-214.

Zimmerman ES, Heibeck TH, Gill A, Li X, Murray CJ, Madlansacay MR, Tran C, Uter NT, Yin G, Rivers PJ, Yam AY, Wang WD, Steiner AR, Bajad SU, Penta K, Yang W, Hallam TJ, Thanos CD, Sato AK. 2014. Production of site-specific antibody-drug conjugates using optimized non-natural amino acids in a cell-free expression system. *Bioconjug. Chem.* **25**(2): 351-361.

Zykwinska AW, Ralet MC, Garnier CD, Thibault JF. 2005. Evidence for *in vitro* binding of pectin side chains to cellulose. *Plant Physiol.* **139**(1): 397-407.

Sites internet :

<http://www.WallMabdb.net>

http://www.personal.psu.edu/fsl/ExpCentral/about_expansins.htm

<http://www.cerc.uga.edu/~mao/rg2/intro.htm>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>

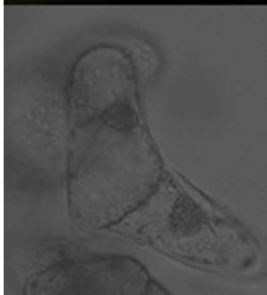
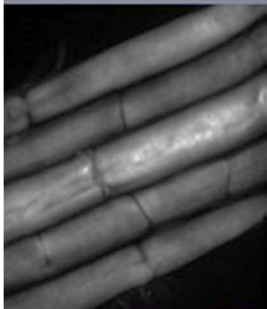
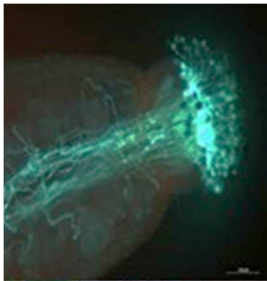
http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner

<http://www.gatc-biotech.com>

<http://www.gimp.org>

<http://www.graphpad.com>

Références bibliographiques



VI-ANNEXES

ANNEXES

Liste des amorces utilisées

1. PCR

Nom	Amorce sens	Amorce antisens
sia2-1	5'-GCAAATGGTTTGGGACTACAA-3'	5'-TGTTTCAGGAAGCACCAATG-3'
LBb1.3	5'-ATTTTGCCGATTTTCGGAAC-3'	
sia2-2	5'-CGCAGCGTTTTATAAAGTGAAA-3'	5'-ACAAGCATGGGACAATGATG-3'
LB2	5'-GCTTCCTATTATATCTTCCCAAATTACCAATACA-3'	
PPE50	5'-GGATGGAAAAATGGATCACC-3'	
pBI101.3	5'-GCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAG-3'	

2. qPCR

Nom	Amorce sens	Amorce antisens
SIA2-1-flanking	5'-CAAATGGAAAGATCCCAAGTCTGG-3'	5'-CCCATCCATTTGGTAAGGCA-3'
SIA2-2-flanking	5'-CCTGGAAATCACGAAGCTGA-3'	5'-GACTCGTAGAGATTAGAGACGC-3'
SIA2-3'UTR	5'-GCGCCATTGTTAGGAGTTGA-3'	5'-GCTTTGTTCTCTTTTCAGTCCTCT-3'
At3g28750	5'-AGGCGATGGTTATTGCACAAGC-3'	5'-TGCCCAACTTAACAGCGAGGTC-3'
At3g57690	5'-AAGAAGATTGCTTGCGGTGTGC-3'	5'-AAAGAGCCAAGAGCTGGCAACG-3'
At5g59370	5'-GCAGATGTGGATTGCGAAAGCAG-3'	5'-CCGTCTTCGTTTGGTGATCTTAGG-3'

Protocole 1.

Category by field: Plant Science > Plant cell biology > Cell staining

Category by field: Cell Biology > Cell imaging > Fixed-tissue imaging

Category by field: Cell Biology > Cell imaging > Fluorescence

Category by organism: Plants > Arabidopsis > Pollen > Morphology

A simple protocol for the Immunolabelling of Arabidopsis Pollen Tube Membranes and Cell Wall Polymers

Marie Dumont¹, Céline Cataye², Arnaud Lehner¹, Eric Maréchal², Patrice Lerouge¹, Denis Falconet^{2*}
and Jean-Claude Mollet^{1*}

¹Laboratoire de Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale (Glyco-MEV) EA4358, Normandy University, University of Rouen, Institut de Recherche et d'Innovation Biomédicale, 76821 Mont-Saint-Aignan, France ; ²Laboratoire de Physiologie Cellulaire Végétale, CNRS-(UMR5168)/INRA-(UMR1200)/Université Joseph Fourier-Grenoble 1/CEA-iRTSV, 38054 Grenoble Cedex 9, France

*For correspondence: denis.falconet@cea.fr; jean-claude.mollet@univ-rouen.fr

[Abstract] The pollen tube, a fast tip-growing cell, is an excellent model to study membrane and cell wall biosynthesis. The method describes a simple protocol using an easy to use device to perform immunofluorescence labelling of pollen tube membrane and cell wall. The use of the NucleoSpin column to perform all the steps of the immunolabelling procedure results in obtaining more intact pollen tubes.

Materials and Reagents

1. *Arabidopsis* day-0 flowers according to Boavida and McCormick (2007). Choose the last inflorescence buds opened at the top of the inflorescence stem. The stamen must not be higher than the stigma.
2. Fetal Bovine Serum (FBS) (Sigma-Aldrich, catalog number: F0804)
3. Goat serum (Sigma-Aldrich, catalog number: G9023)
4. Saponin (Sigma-Aldrich S4521)
5. Primary antibody against plant cell wall polysaccharides/glycoproteins (<http://www.plantprobes.net> or <http://www.ccruc.uga.edu/~carbosource>) or digalactosyldiacylglycerol (DGDG) prepared in the laboratory using purified DGDG as antigen.
6. Secondary antibodies conjugated to Alexa Fluor 488 (Life Technology, cat number: A-11008) or Fluorescein isothiocyanate (FITC) (Sigma-Aldrich, cat number F0382)
7. Arabidopsis pollen germination medium (PGM) (see Recipes)
8. 1x Tris-buffered saline (TBS) (see Recipes)
9. Fixation solution (see Recipes)

10. Calcium- and magnesium-free Dulbecco's phosphate-buffered saline (CMF-DPBS) (see Recipes)
11. Blocking buffer 1 (see Recipes)
12. Blocking buffer 2 (see Recipes)

Equipment

1. Pair of tweezers
2. Olympus CK2 inverted microscope
3. Microscope Zeiss AxiObserver Z1
4. Syringe Filter PVDF 33 mm 0.2 μm
5. Microcentrifuge (VWR™ Galaxy 14D)
6. NucleoSpin® Plasmid Binding Columns (Macherey-Nagel, catalog number: 740588.50), *but columns of any other kits (Genejet or PureLink) may be used.*
7. Incubators at 22 °C and 30 °C
8. Parafilm®
9. Confocal Microscope TCS-SP2 operating system (Leica) and microscope Leica DMI6000B with a DFC450 C camera with FITC filter (absorption, 485–520 nm; emission, 520–560 nm wavelengths)

Procedure

A. *In vitro Arabidopsis* pollen tube growth and fixation

Note : See also the protocol available at <http://www.bio-protocol.org/e73>. However we advice to use the conditions detailed in the following protocol (number of flowers, PGM volume, temperature) to enhance the reproducibility.

1. Grow *Arabidopsis* pollen *in vitro* according to the method described by Boavida and McCormick (2007).
 - a. Harvest 40 freshly open *Arabidopsis thaliana* flowers (morning is the best) using a pair of tweezers.
 - b. Submerge in 1 ml of PGM in a 1.5 ml Eppendorf tube.
 - c. Shake the tube vigorously manually and with a vortex for 5 min to release the pollen grains from the anthers.
 - d. Check the pollen number density with an inverted microscope.
 - e. Remove all the flower debris with a pair of tweezers.
 - f. Spin-down the pollen suspension using the microcentrifuge at 3,200 $\times g$ for 7 min (a yellowish pellet should be visible).
 - g. Remove the supernatant by pipetting.
 - h. Add 250 μl of PGM and resuspend the pellet.
 - i. Place the tube horizontally in the incubator at 22 °C in the dark for 6 h.

- j. After 6 h, check for pollen germination and pollen tube growth with the inverted microscope (Figure 1).

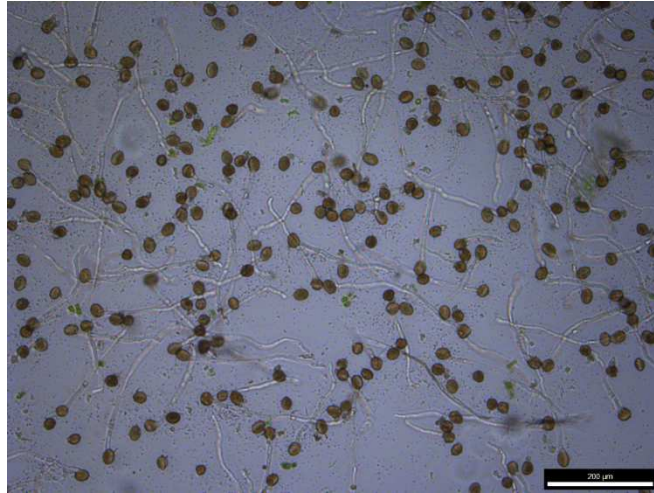


Figure 1: 6 h-old *Arabidopsis* pollen tubes. Note that the pollen grain density is important to obtain good pollen germination rates.

B. Pollen tube fixation and immunolabelling

Note: The protocol described below is adapted from Botté et al. (2011) and Dumont et al. (2014) for pollen membrane and pollen cell wall labelling respectively. Medium can be removed either by aspiration by connecting the NucleoSpin® Plasmid Binding Column to a vacuum such as a water aspirator (Figure 2) or by centrifugation at 300 x g for 1 min in a microcentrifuge. In the aspiration method, the flow-through is discarded and the germinated pollens present on the silica membrane are gently resuspended in the appropriate buffer. Although very similar the two protocols differs with an additional permeabilization step for pollen tube membrane labelling (step 4) and the use of different buffers (Figure 4). Buffers used for the cell wall labelling (Dumont et al., 2014) are written between parentheses.



Figure 2. NucleoSpin® Plasmid Binding Columns connected to a hose for aspiration

1. Pollen tubes in PGM were mixed (v/v) with a fixation medium containing 5% methanol-free formaldehyde in TBS buffer (or 5% formaldehyde in the fixation solution). Pollen tubes are incubated overnight at 4 °C before use (do not store the pollen tubes longer than 1 month).
2. Transfer the pollen tubes solution on a NucleoSpin® Plasmid Binding Column held on a collection tube, under the fumehood.

Note: All transfer and all washing steps described below are performed with a tip cut 0.5 cm from its extremity to avoid pollen tube damages (such ready to use wide bore pipet tips are available here: http://www.thomassci.com/Supplies/Pipettor-Tips/_/200l-Clear-Wide-Bore-Pipet-Tips?q=Wide%20Tip%20Pipet or <http://catalog2.corning.com/LifeSciences/en-US/Shopping/ProductDetails.aspx?productid=T-205-WB-C%28Lifesciences%29&categoryname=>).

3. Remove the medium by aspiration or centrifugation and wash three times with 100 µl TBS buffer (or CMF-DPBS, both filtered at 0.22 µm using a syringe filter). Pollen tubes are gently resuspended in the buffer by pipetting up and down and the buffer is removed by aspiration/centrifugation.
4. Seal the bottom of the column with parafilm® and add 100 µl 0.002% saponin in TBS for 15 min for pollen membrane permeabilization (skip this step and the next one for the cell wall immunolabeling).
5. Remove the medium by aspiration/centrifugation.
6. Seal the bottom of the column with parafilm® and incubate the pollen tubes with 100 µl blocking buffer 1 (or blocking buffer 2), freshly prepared, for 1 h.
7. Remove the blocking buffer by aspiration/centrifugation.
8. The cell wall labelling requires three washes with CMF-DPBS as explained in step B3 (Skip this step for the membrane immunolabelling).
9. Seal the bottom of the column and add 50 µl of primary antibody 1:10 dilution DGDG-specific rabbit serum in TBS-1%FBS-0.002% saponin and incubate 1 h at room temperature (or for the cell wall labelling: 1:20 primary antibody in CMF-DPBS overnight at 4 °C). Negative controls are prepared by omitting the primary antibody.
10. Wash three times with TBS-1% FBS-0.002% saponin (or CMF-DPBS) as explained in step B3.
11. Seal the bottom of the column and add 50 µl 1:500 dilution Alexa secondary antibody in TBS-1%FBS-0.002% saponin and incubate 1 h at room temperature (or for the cell wall labelling: FITC-coupled secondary antibody 1:50 dilution in CMF-DPBS for 2 h at 30 °C).

Note: From this step, keep the tubes in the dark in aluminum foil.

12. Wash four times in TBS-1% FBS-0.002% saponin and a final wash with TBS (or five times with CMF-DPBS) as explained in step B3.
13. In order to recover the pollen tubes, resuspend them by adding at the top of the column 100 µl of TBS (or water) and by pipetting up and down several times with an enlarged tip and transfer the solution which contains the pollen tubes on a microscope slide with a cover slip. Figure 3 shows the confocal images showing the results of immunofluorescence labelling of *Arabidopsis* pollen tubes with anti-DGDG. Figure 4 gives an overview of the method for the membrane or cell wall immunolabelling of pollen tubes.

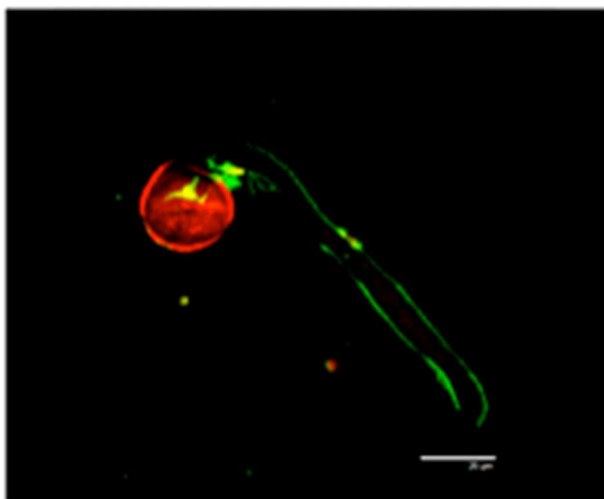


Figure 3. *Arabidopsis* pollen grains were germinated for 6 h, pollen tubes were fixed and the pollen tube membrane immunolabelled with anti-DGDG antibodies. Alexa 488 was excited using the 488 nm line of an argon laser and fluorescence was collected between 500-539 nm. **Superposition of control red autofluorescence induced by excitation at 543 nm laser is also shown.**

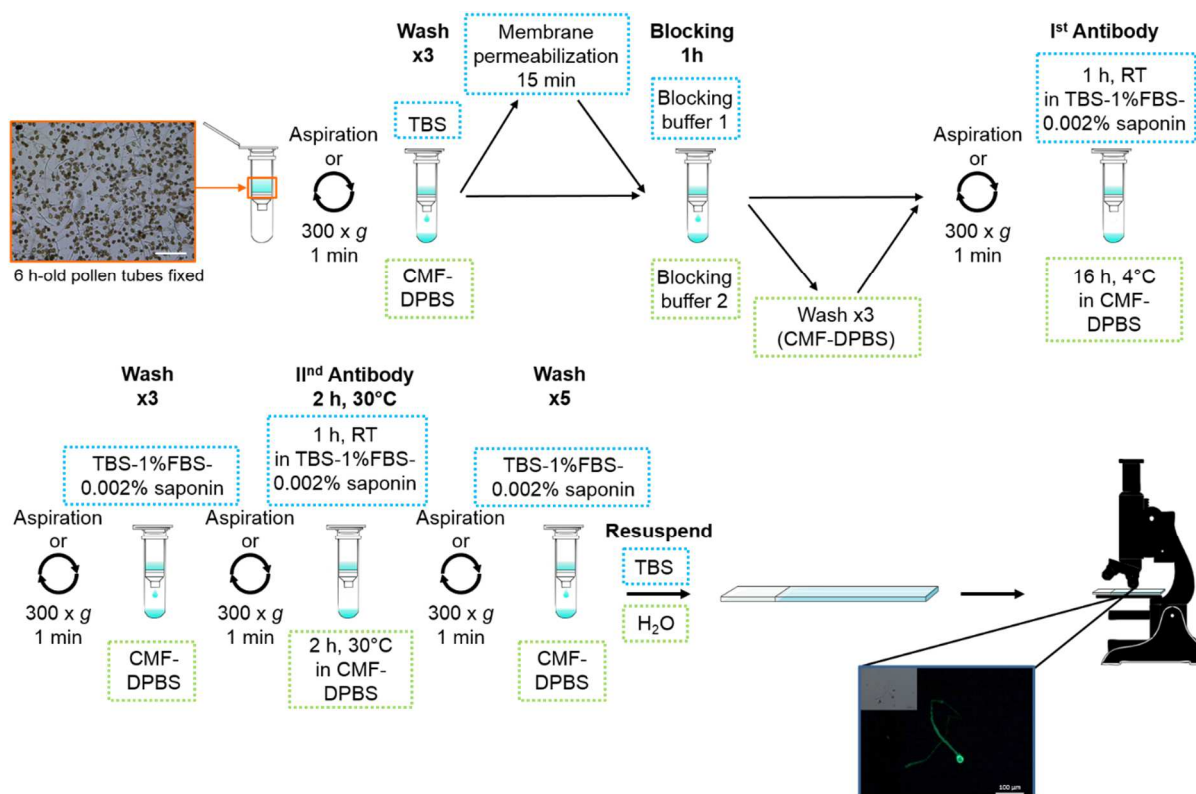


Figure 4. Schematic representation of the sample preparation for *Arabidopsis* pollen tubes plasma membrane and cell wall immunolabelling. Green dashed box indicates special step or buffer for plasma membrane labelling whereas blue dashed box points out the steps for the cell wall labelling. The picture at the bottom of the image shows a pollen tube labelled with an anti-rhamnogalacturonan-II (a pectic motif) antibody developed by Match *et al.*, (1998) using a microscope Leica DMI6000B equipped with a DFC450 C camera (FITC filter: absorption, 485–520 nm; emission, 520–560 nm wavelengths).

Recipes

1. Arabidopsis Pollen Germination Medium (PGM)
 - 5 mM CaCl₂
 - 0.01% H₃BO₃
 - 1 mM MgSO₄
 - 5 mM KCl
 - 10% (w/v) sucrose
 - pH 7.5
2. 1x Tris-buffered saline (TBS)
 - 50 mM Tris-HCl
 - 150 mM NaCl
 - pH 7.4
3. Fixation solution
 - 100 mM PIPES buffer pH 6.9
 - 4 mM MgSO₄ 7H₂O
 - 4 mM EGTA
 - 10% (w/v) sucrose
 - 5% (v/v) paraformaldehyde
4. Calcium- and magnesium-free Dulbecco's phosphate-buffered saline (CMF-DPBS)
 - 137 mM NaCl
 - 2.7 mM KCl
 - 7 mM Na₂HPO₄ 7H₂O
 - 1.5 mM KH₂PO₄
 - pH 7.2
5. Blocking buffer 1
 - 1x TBS
 - 5% (w/v) FBS
 - 5% (w/v) goat serum
 - 0.002% Saponin
6. Blocking buffer 2
 - 137 mM NaCl
 - 2.7 mM KCl
 - 7 mM Na₂HPO₄ 7H₂O
 - 1.5 mM KH₂PO₄
 - pH 7.2
 - 3% fat-free milk

Note : It is better to filter at 0.22 µm using a syringe filter all the washing solutions.

Acknowledgments

Original versions of the protocols were described in Dardelle *et al.* (2010), Botté *et al.* (2011) and Dumont *et al.* (2014). This work was supported by the University of Rouen, the region Haute Normandie, and the “Trans Channel Wallnet” project that was selected by the INTERREG IVA program France (Channel) – England European cross-border cooperation program, which is co-financed by the European Regional Development Funds (ERDF). The work performed at LPCV (Grenoble) was supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-10-BLAN-1524, ReGal; ANR BioAdapt Reglisse).

References

1. Boavida, L.C. and McCormick, S. (2007). TECHNICAL ADVANCE: Temperature as a determinant factor for increased and reproducible *in vitro* pollen germination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 52(3): 570-582.
2. <http://www.bio-protocol.org/e73>
3. Botté, C.Y., Deligny, M., Rocchia, A., Bonneau, A.L., Saïdani, N., Hardré, H., Aci, S., Yamaryo-Botté, Y., Jouhet, J., Dubots, E., Loizeau, K., Bastien, O., Bréhélin, L., Joyard, J., Cintrat, J. C., Falconet, D., Block, M. A., Rousseau, B., Lopez, R., and Maréchal, E. (2011). Chemical inhibitors of monogalactosyldiacylglycerol synthases in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Chem Biol* 7(11): 834-842.
4. Dardelle, F., Lehner, A., Ramdani, Y., Bardor, M., Lerouge, P., Driouich, A. and Mollet, J.C. (2010). Biochemical and immunocytological characterizations of *Arabidopsis* pollen tube cell wall. *Plant Physiol* 153(4): 1563-1576.
5. Dumont, M., Lehner, A., Bouton, S., Kiefer-Meyer, M.C., Voxeur, A., Pelloux, J., Lerouge, P., and Mollet, J.C. (2014). The cell wall pectic polymer rhamnogalacturonan-II is required for proper pollen tube elongation: implications of a putative sialyltransferase-like protein. *Ann Bot* 114(6): 1177-1188.
6. <http://www.plantprobes.net>
7. <http://www.ccrcc.uga.edu/~carbosource>
8. Match, T., Takasaki, M., Takabe, K., and Kobayashi, M. (1998) Immunocytochemistry of rhamnogalacturonan II in cell walls of higher plants. *Plant Cell Physiol* 39: 483–491.

Protocole 2.

Category by field: Plant Science > Plant biochemistry > Carbohydrate

Category by field: Biochemistry > Carbohydrate > Polysaccharide

Category by organism: Plants > Arabidopsis > Pollen > carbohydrate

Analysis of Sugar Component of a Hot Water Extract from *Arabidopsis thaliana* Pollen Tubes using GC-EI-MS.

Marie Dumont¹, Arnaud Lehner¹, Corinne Loutelier-Bourhis², Jean-Claude Mollet¹ and Patrice Lerouge^{1*}

¹Laboratoire de Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale (Glyco-MEV) EA4358, Normandy University, University of Rouen, Institut de Recherche et d'Innovation Biomédicale, 76821 Mont-Saint-Aignan, France; ²Normandie Université, COBRA, UMR 6014 et FR 3038, Université de Rouen, INSA de Rouen, CNRS, IRCOF, 1 rue Tesnière, 76821, Mont-Saint-Aignan Cedex, France.

*For correspondence: patrice.lerouge@univ-rouen.fr

[Abstract] Extraction with hot water is the oldest and simplest method used to recover pectin from an alcohol insoluble residue extract, although this method has not been widely used for the cell wall analysis of pollen tube, a model used to study cell wall. This protocol described this method applied for pectin extraction from 6 h-old *Arabidopsis* pollen tubes followed by a sugar composition analysis by gas chromatography mass spectrometry.

Materials and Reagents

1. *Arabidopsis* day-0 flowers according to Boavida and McCormick (2007)
2. Absolute ethanol for analysis (Merck Millipore, catalog number: 107017)
3. Trifluoroacetic acid 12.93N (TFA) (Sigma-Aldrich Reagent Plus®, catalog number: T62200)
4. *Myo*-inositol 2 mM (Sigma-Aldrich, catalog number: I5125)
5. Methanolic-HCl 3N (Sigma-Aldrich, catalog number: 33051 Supelco)
6. Methanol (Fisher chemical, catalog number: 10010280)
7. Silylation reagent (HMDS:TMCS:Pyridine, 3:1:9 Sylon™ HTP) (Sigma-Aldrich, catalog number: 33038 Supelco)
8. Cyclohexane (Acros Organics, catalog number: 279590010)
9. *Arabidopsis* pollen germination medium (see Recipes)
10. Monosaccharides standards

Arabinose (Sigma-Aldrich, catalog number A3256)
Fucose (Sigma-Aldrich, catalog number F8150)
Galactose (Sigma-Aldrich, catalog number G0750)
Galacturonic acid (Sigma-Aldrich, catalog number 857289)
Glucose (Merck Millipore, catalog number 8337.0250)
Glucuronic acid (Sigma-Aldrich, catalog number G8645)
Mannose (Sigma-Aldrich, catalog number M4625)
Rhamnose (Sigma-Aldrich, catalog number R3875)
Xylose (Sigma-Aldrich, catalog number X2126).

Equipment

1. Inverted microscope Olympus CK2
2. Centrifuge Allegra® X-15R Beckmann Coulter
3. Hot-water bath (70 °C and 90 °C)
4. 40-ml glass potter homogenizer
5. Freeze-dryer
6. Incubator (22 °C, 80 °C and 110 °C)
7. Sample concentrator under air flow (Techne, catalog number: FSC400D)
8. GC-EI-MS instrument is composed of a Zebron Z5-MSi (30 m, 0.25 mm id, 0.25 µm film thickness, Phenomenex) capillary column for chromatographic separations, a Hewlett-Packard 6890 series gas chromatograph coupled to an Autospec mass spectrometer of EBE geometry (Micromass, Manchester, UK) equipped with a Opus 3.1 data system
9. 1.5 ml Eppendorf tube
10. Vortex
11. Pair of tweezers
12. 50-ml Falcon
13. Microliter syringe (10 µL, Hamilton)

Procedure

A. *In vitro Arabidopsis* pollen tubes growth and fixation

The protocol described below is similar to the one available at <http://www.bio-protocol.org/e1131> with several differences.

1. Grow *in vitro Arabidopsis* pollen according to the method described by Boavida and McCormick (2007).
 - a. Harvest 40 freshly open *Arabidopsis thaliana* flowers (morning is the best).
 - b. Submerge in 1 ml of pollen germination medium in a 1.5 ml Eppendorf tube.
 - c. Shake the tube vigorously manually and using a vortex for 5 min to release the pollen grains from the anthers.

- d. Check the pollen density with an inverted microscope.
 - e. Remove all the flower debris with a pair of tweezers.
 - f. Spin-down the pollen suspension at 3,200 x g for 7 min (a yellowish pellet should be visible).
 - g. Remove the supernatant.
 - h. Add 250 µl of pollen germination medium and resuspend the pellet.
 - i. Place the tube horizontally in the incubator at 22 °C in the dark for 6 h.
 - j. After 6 h, check for pollen germination and pollen tube growth with the inverted microscope (Figure 1).
2. Fix the pollen culture by adding 750 µl absolute EtOH (final concentration 75% EtOH) and keep at 4 °C (no longer than one month).

Note : Around 90 pollen cultures (3,600 flowers) are needed for the detection of minor sugars such as the Kdo (2-keto-3-deoxy-D-manno-octulosonic acid), one of the constituents of rhamnogalacturonan-II (RG-II). For other major cell wall components, pollen tubes from 400 flowers are generally sufficient.

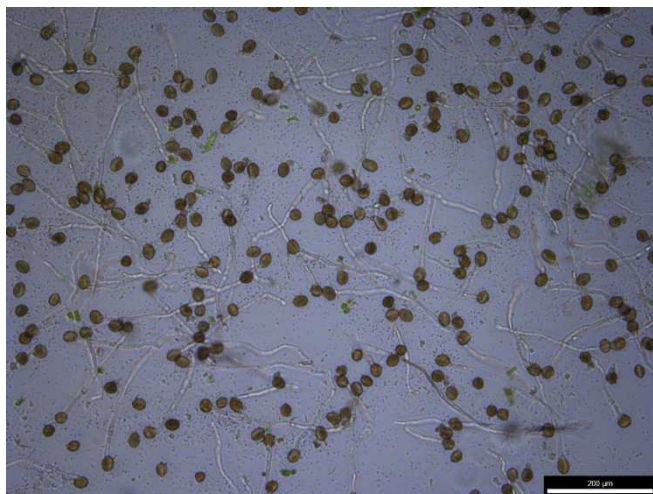


Figure 1: 6 h-old *Arabidopsis* pollen tubes. Note that the pollen grain density is important to obtain a good germination rate.

B. Pectin extraction and analysis

1. Hot water pectin extraction:

- a. Pool all the pollen cultures in a 50-ml Falcon® tube and centrifuge at 4,700 g for 5 min. Repeat the centrifugation step if the total volume of the pollen cultures exceeds 45 mL.
- b. Discard the supernatant and wash with 15 mL EtOH 70% to remove salt and sucrose from the germination medium.
- c. Incubate in hot-water bath at 70 °C for 15 min.
- d. Grind the material manually with a 40-ml glass potter homogenizer until no debris are visible.
- e. Centrifuge at 4,700 x g for 5 min and discard the supernatant.

- f. Allow the pellet to dry until no supernatant is visible (it might take no more than 2 h using a stream of dry air).
 - g. Resuspend the pellet in 5 ml distilled water.
 - h. Incubate in a hot-water bath at 90 °C for 1 h.
 - i. Centrifuge at 4,700 x g for 5 min.
 - j. Freeze-dry the supernatant. No liquid must be visible (it might take one day).
2. Sample preparation for gas chromatography analysis:
- Notes: Glassware tubes are preferentially used for the sample preparation. A standard sample containing the most common cell wall monosaccharides (Ara, Fuc, Gal, GalUA, Glc, GlcUA, Man, Rha, Xyl) is prepared at the same time without the TFA hydrolysis step.*
- a. Hydrolyze the extract with 250 µl TFA 2N (see recipes) for 2 h at 110 °C.
 - b. Add 50 µl of *myo*-inositol 2 mM in the sample. *Myo*-inositol is used as an internal standard.
 - c. Perform a methanolysis for 16 h at 80 °C using 250 µl of dried 1 M methanolic-HCl (dilute the 3 M stock solution with methanol).
 - d. Wash the sample twice using 500 µl methanol.
 - e. Convert the methyl glycosides into their trimethylsilyl derivatives at 110 °C for 20 min with 200 µl of the silylation reagent (HMDS: TMCS: Pyridine, 3:1:9, Supelco).
 - f. Wash twice the sample using 500 µl cyclohexane.
 - g. *Note: Air dry the sample using a stream of dry air with a sample concentrator between each step (a nitrogen flow can be used as well).* Add 1 ml cyclohexane and vortex the tube.
3. Monosaccharides analysis:
- a. Inject 0.5 µl of the sample in the GC-EI-MS instrument, using a 10 µL syringe, in splitless mode. Helium is the carrier gas and the flow-rate is 0.8 ml/min.
 - b. Start the temperature programming at 120 °C for 2 min, ramp to 160 °C at 10 °C/min, then to 220 °C at 1.5 °C/min and finally ramp to 280 °C at 15 °C/min (maintain at 270 °C for 1 min). The temperatures of the injector, the interface and the lines are 250 °C. Record the EI mass spectra using an electron energy of 70 eV, an acceleration voltage of 8 kV and a resolving power of 1,000. The trap current of 200 µA and the magnet scan rate is 1 s/decade over a *m/z* range 600-38. The temperature of ion source is 250 °C.
 - c. The data are processed with the software STAR Workstation Varian 5.52. First of all, it is important to check that peak and peak areas (*A*) are assigned correctly for each spectrum by comparing with the standard sample before proceeding. The response factor (*R_f*) for each monosaccharide has been determined previously by calibration of the instrument for each standard sugar. Peak area is integrated on the total chromatogram for each sugar and for the internal standard (inositol). The amount of each sugar is calculated by the formula:

$$\text{Sugar concentration (x)} = \frac{\left[(\text{inositol concentration} \times \text{peak area (x)}) \div \text{inositol peak} \right]}{(R_f(x))}$$

Figure 2 gives an overview of the complete protocol.

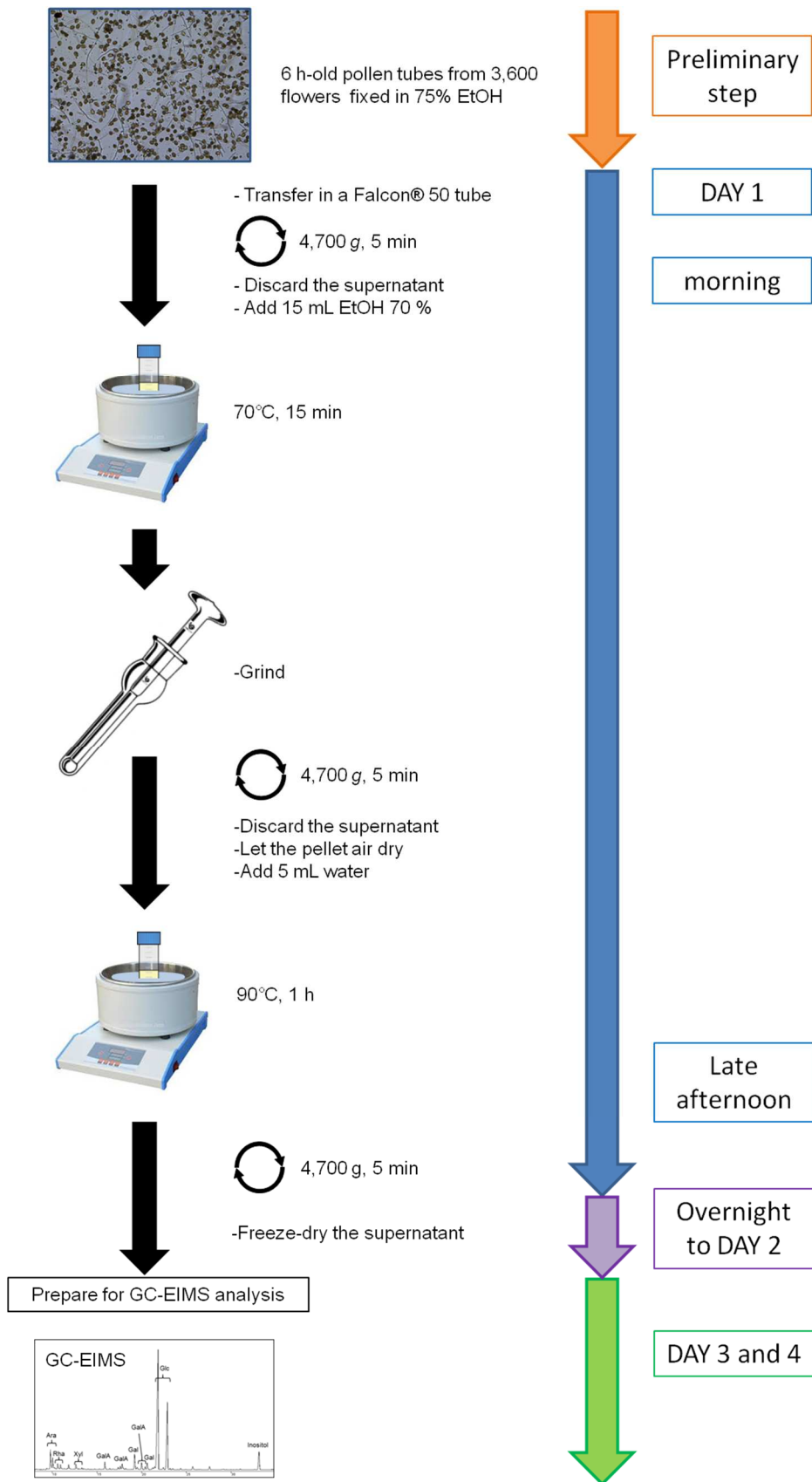


Figure 2. Schematic representation of the protocol for sugar composition of a hot water extract from *Arabidopsis thaliana* pollen tubes

Recipes

1. *Arabidopsis thaliana* pollen germination medium:
5 mM CaCl₂
0.01% H₃BO₃
1 mM MgSO₄
5 mM KCl
10% (w/v) sucrose
pH 7.5
2. Trifluoroacetic acid (2N)
0.15 volume of Trifluoroacetic acid 12.93N (see reagents)
0.85 volume of fresh distilled water
Note: use glassware.

Acknowledgments

This protocol was initially described in Dumont *et al.* (2014). This work was supported by the University of Rouen, the region Haute-Normandie, and the “Trans Channel Wallnet” project that has been selected by the INTERREG IVA program France (Channel) – England European cross-border cooperation programme, which is co-financed by the ERDF. The authors also thank the Labex SynOrg (ANR-11-LABX-0029, CRUNCH network, and the European Regional Development Fund (ERDF 31708).

References

1. Boavida, L. C. and McCormick, S. (2007). TECHNICAL ADVANCE: Temperature as a determinant factor for increased and reproducible *in vitro* pollen germination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 52(3): 570-582.
2. <http://www.bio-protocol.org/e1131>
3. Dumont, M., Lehner, A., Bouton, S., Kiefer-Meyer, M. C., Voxeur, A., Pelloux, J., Lerouge, P. and Mollet, J. C. (2014). The cell wall pectic polymer rhamnogalacturonan-II is required for proper pollen tube elongation: implications of a putative sialyltransferase-like protein. *Ann Bot* 114(6): 1177-1188.

Marie DUMONT
 5, rue Chateaubriand
 91600 Savigny-sur-Orge
 06.87.37.79.25
 mariedumont1989@gmail.com

Anglais courant
 Italien opérationnel
 25 ans

EXPERIENCES PROFESSIONNELLES

2012-2015 – Doctorante, *Laboratoire Glyco-MEV EA4358, Rouen*

Conduite d'un projet de recherche européen portant sur le rôle de la paroi cellulaire végétale dans l'élongation cellulaire

- Techniques de **biochimie** (chromatographies, spectrométrie de masse, électrophorèses, extraction de protéines)
- Techniques de **biologie moléculaire** et **biotechnologies** (clonage dans *E.coli* et *A.tumefaciens*, florldip, RT-qPCR, design d'amorces)
- Techniques d'**immunocytochimie** et **click chemistry** (microscopies à épifluorescence et confocale)
- Maîtrise de logiciels de **traitement d'image** (ImageJ, GIMP) et de **statistique** (GraphPad Prism)
- **Collaborations** scientifiques avec plusieurs laboratoires (Europe, USA)
- **Recherche de financements** et **Organisation** de workshop/séminaire scientifiques
- **Communications** écrites, orales et affichées
- **Veille scientifique**
- **Monitorat** niveau Licence et Master

2012 – Assistante de recherche stagiaire, *Laboratoire Glyco-MEV EA4358, Rouen*

6 mois

Caractérisation biochimique de glycoprotéines végétales et implication dans la défense contre un pathogène.

- Techniques de **culture cellulaire** (végétaux, bactéries, oomycètes)
- Techniques de **biochimie** (extraction de polysaccharides et de glycoprotéines)

2011 – Assistante de recherche stagiaire Erasmus, MAICH, Grèce

5 mois

Caractérisation phénotypique de mutant T-DNA chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*.

- Techniques de **biologie moléculaire** (extraction ADN, ARN, reverse transcription, PCR)

2010 – Assistante de recherche stagiaire, *Laboratoire MERCI EA3829, Rouen*

1 mois

Etude d'une lignée de cellules de cancer du sein.

- Techniques de **culture cellulaire** humaine
- Techniques de **biochimie** (extraction de protéines, western blot, cytokine array)

FORMATION

2015 : Doctorat de Biochimie - Physiologie Végétale - Université de Rouen (Soutenance 10 juillet 2015)

2012 : Master Recherche Biologie Santé - Parcours Ecophysiologie et Biotechnologies Végétales

Mention très bien - Université de Rouen.

2010 : Licence Biologie - Option Biochimie et Biologie cellulaire - Major de promotion - Université de Rouen.

CENTRES D'INTERET

Danse africaine, Cuisine du monde, Voyages (Europe, Asie, Etats-Unis)

TRAVAUX DE RECHERCHE

2012-2015 : Doctorat de Biochimie-Physiologie Végétale, Laboratoire Glyco-MEV–EA 4358–Université de Rouen

« Rôle du Rhamnogalacturonane de type II dans l'élongation cellulaire ».

Directeurs de thèse : Pr. Patrice Lerouge et Pr. Jean-Claude Mollet. Soutenance prévue : juillet 2015.

2013 : Séjour scientifique, The Pennsylvania State University–Biology Department (Anderson CT lab) – USA

« Click Chemistry and Fucosyltransferase inhibition combination ».

2012 : Mémoire de recherche, Laboratoire Glyco-MEV–EA 4358–Université de Rouen

« Immunité végétale : caractérisation des Arabinogalactanes protéines de Fabacées et effets sur les oomycètes pathogènes ».

2011 : Mémoire de recherche, Mediterranean Agronomic Institute of Chania–Horticultural Genetics and Biotechnology Department–Grèce(Crète)

«Caractérisation phénotypique de mutants *p4h11* chez *Arabidopsis thaliana*».

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Posters :

Dumont M., Lehner A., Bouton S., Kiefer-Meyer MC., Voxeur A., Pelloux J., Lerouge P. and Mollet JC., 2014. The cell wall pectic polymer rhamnogalacturonan-II is required for proper pollen tube elongation: implications of a putative sialyltransferase-like protein. IASPRR (International Association of Sexual Plant Reproduction Research) 13-18 Juillet 2014, Porto, Portugal.

Dumont M., Voxeur A., Lehner A., Mollet JC. and Lerouge P. Role of Rhamnogalacturonan type II in pollen tube elongation. XIIIth Cell Wall Meeting, Nantes, France. 7-12 Juillet 2013.

Dumont M., Voxeur A., Lehner A., Mollet JC. and Lerouge P. Role of Rhamnogalacturonan type II in pollen tube elongation. 2nd Journée de l'Institut de Recherche et d'Innovation Biomédicale, Rouen. 21 Juin 2013.

Articles :

Dumont M., Lehner A., Loutelier-Bourhis C., Mollet JC, Lerouge P. 2014. Sugar composition of a hot water extract from *Arabidopsis thaliana* pollen tubes. Bio-Protocol. *In press*.

Dumont M., Cataye C., Lehner A., Maréchal E., Lerouge P., Falconet D., Mollet JC, 2014. An easy protocol for immunofluorescence labelling of *Arabidopsis* pollen tubes. Bio-Protocol. *In press*.

Dumont M., Lehner A., Bouton S., Kiefer-Meyer MC, Voxeur A., Pelloux J., Lerouge P., Mollet JC. 2014. The cell wall pectic polymer rhamnogalacturonan-II is required for proper pollen tube elongation: implications of a putative sialyltransferase-like protein. *Ann Bot.* 114(6):1177-1188.

Séminaires :

Leroux C., **Dumont M.**, Driouich A., Lerouge P., Mollet JC., Lehner A. Biosynthesis and remodelling of pollen tube cell wall. 1^{ère} journée scientifique Université Cadi Ayyad-Université de Rouen, Marrakech, Morocco. April 22-24th 2014.

Dumont M., Bardor M., Lehner A., Mollet JC. and Lerouge P. Fucosyltransferase inhibitor: a tool to study plant cell wall biosynthesis. 17^{èmes} journées de l'EdNBISE. 10-11 Avril 2014. Le Havre.

Dumont M., Bardor M., Lehner A., Mollet JC. and Lerouge P. Identification of Glycosyltransferases involved in Rhamnogalacturonan II biosynthesis. Charlie Anderson's lab, Université de Pennsylvania State (USA). 4 décembre 2013.

