Implication des pectines méthyl-estérases (PMEs) et de leurs inhibiteurs (PMEIs) au cours de la germination du grain de pollen et de la croissance polarisée du tube pollinique chez Arabidopsis thaliana

Christelle Leroux

▶ **To cite this version:**

Christelle Leroux. Implication des pectines méthyl-estérases (PMEs) et de leurs inhibiteurs (PMEIs) au cours de la germination du grain de pollen et de la croissance polarisée du tube pollinique chez Arabidopsis thaliana. Botanique. Université de Rouen Normandie, 2015. Français. NNT : . tel-02067530

HAL Id: tel-02067530

https://normandie-univ.hal.science/tel-02067530

Submitted on 14 Mar 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.

THESE

Pour obtenir le grade de Docteur

opéré par l'Université de Rouen

Spécialité : Sciences du végétal

Implication des pectines méthyl-estérases (PMEs) et de leurs inhibiteurs (PMEIs) au cours de la germination du grain de pollen et de la croissance polarisée du tube pollinique chez *Arabidopsis thaliana*

Présentée et soutenue publiquement par
Christelle LEROUX

Thèse soutenue publiquement le (date de soutenance) devant le jury composé de		07-09-2015
Mme Silvia COIMBRA	Professeur, Université de Porto	Rapporteur
Mme Marie-Christine RALET	Directeur de Recherche, INRA de Nantes	Rapporteur
Mr Jérome PELLOUX	Professeur, Université d'Amiens	Examinateur
Mme Claudine MORVAN	Chargée de Recherche CNRS, Université de Rouen	Examinateur
Mr Jean-Claude MOLLET	Professeur, Université de Rouen	Directeur
Mr Arnaud LEHNER	Maître de conférences, Université de Rouen	Co-encadrant
Mr Azeddine DRIOUICH	Professeur, Université de Rouen	Membre invité

Thèse dirigée par Jean-Claude MOLLET (et Arnaud LEHNER, co-encadrant), **laboratoire Glyco-MEV**

Remerciements

Au terme de ces trois années de thèse passées dans le laboratoire Glyco-MEV, j'ai le plaisir d'exprimer ma reconnaissance et mes remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin au bon déroulement de ma thèse.

Tout d'abord, je tiens aussi à remercier le Pr Silvia COIMBRA, le Dr Marie-Christine RALET, le Pr Jérome PELLOUX, le Dr Claudine MORVAN et le Pr Azeddine DRIOUICH qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail et qui ont assumé la tâche de rapporteurs et d'examinateurs de cette thèse.

Mes remerciements s'adressent aussi aux co-directeurs du laboratoire Glyco-MEV, Pr Patrice LEROUGE et Pr Azeddine DRIOUICH, pour m'avoir accueillie au sein de leur organisme de recherche. J'en profite également pour remercier Azeddine de m'avoir soutenue dans ma volonté de partir 6 mois en ERASMUS au Portugal, au sein de l'équipe du Pr Silvia COIMBRA, lors de ma première année de Master, cela n'aurait pas été possible sans lui.

Puis, mes remerciements s'adressent à mon directeur de thèse, le Pr Jean-Claude MOLLET, pour son aide et ses encouragements prodigués tout au long de ce travail de recherche, ainsi que pour sa disponibilité, sa rigueur scientifique, son enthousiasme et ses précieux conseils qui m'ont permis de travailler dans les meilleures conditions.

Je remercie aussi mon co-encadrant de thèse, le Dr Arnaud LEHNER, pour m'avoir suivie au cours de ces années de doctorat, ainsi que durant le stage de ma deuxième année de Master, avec un encadrement rigoureux et de qualité. Je le remercie pour sa confiance, ainsi que pour son regard avisé sur mes travaux.

Il m'est très agréable d'exprimer toute ma gratitude, ma reconnaissance et mes très vifs remerciements à la Région Haute-Normandie *via* le réseau IRIB, et le pôle CBS, qui m'a soutenue financièrement.

J'adresse mes sincères remerciements à l'ensemble des membres de mon équipe d'accueil, en particulier Marie-Christine KIEFER-MEYER, Gaëlle LUCAS, Carole BUREL, Carole PLASSON et Alain MARECK pour leurs hautes compétences scientifiques qui m'ont été d'une aide très précieuse me permettant d'avancer dans ma thèse. De plus, je

remercie Claudine MORVAN et Sophie BOUTON, pour les expérimentations de FT-IR et de qRT-PCR, respectivement. Je remercie ces personnes pour toutes les discussions, suggestions et leurs précieux conseils.

Un grand merci aux services communs du laboratoire, au réseau de recherche VASI de la Région Haute-Normandie pour l'utilisation des microscopes et à la plateforme PRIMACEN (Plate-forme Régionale pour l'Imagerie CEllulaire de haute-Normandie) appartenant à l'Institut de Recherche et d'Innovation en Biomédecine (IRIB), pour l'utilisation du microscope confocal, en particulier Ludovic GALAS et Sophie BERNARD.

Merci à Flavien, Marie, Ferdousse, Clément, François, Abdoul et les autres thésards du laboratoire qui m'ont apporté un grand soutien. Leur aide permanente et leurs compétences m'ont permis d'avancer dans ce travail.

Un grand merci aussi à Gérald, notre gestionnaire, pour son soutien logistique de tous les instants.

Je remercie également Julien et Marion, les deux stagiaires que j'ai eu le plaisir d'encadrer au sein du laboratoire durant ma thèse, et qui m'ont bien aidée sur ce projet, Julien pour les extractions protéiques et Marion pour l'analyse du mutant *pme23-1*.

Mes remerciements les plus profonds vont à mes amis et à ma famille. Merci à mon compagnon Marco Polo pour sa patience, son soutien et ses encouragements.

Merci à mes parents qui m'ont donné la possibilité de poursuivre et de terminer mes études, qui ont été présents lorsque c'était plus dur. Merci à maman pour la relecture, merci à papa pour les petits plats du mercredi. Merci à mon frère Cyrille, mes soeurs Nadège et Sabine, ainsi que mes cousines Lucie et Mathilde qui, par leurs petites attentions au téléphone me donnaient du courage pour mener à bien mon travail. Merci à mes grand-mères (MamieLy et Mamie-Françoise) qui m'ont soutenue et encouragée comme elles le pouvaient. Je dédie ces travaux à mon grand-père Rémy, décédé durant la rédaction de ce mémoire. C'est dans ses vergers que petite j'ai développé ma curiosité envers la nature et principalement les plantes, notamment le fait que : « chaque pomme était une fleur qui a connu l'amour » (Citation de F. Leclerc, poète québecois, extrait de *Le Calepin d'un Flâneur*, 1961).

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES I

LISTE DES ABREVIATIONS VII

LISTE DES FIGURES XI

LISTE DES TABLEAUX XV

I. INTRODUCTION 1

I. 1. INTRODUCTION GÉNÉRALE : 1

I. 2. LA REPRODUCTION SEXUÉE : 3

I. 2. A. ANATOMIE DE LA FLEUR : 3

I. 2. B. LA DOUBLE FECONDATION CHEZ LES ANGIOSPERMES : 4

I. 2. C. FORMATION DES GAMETOPHYTES : 6

2. c. 1. Formation des ovules : 6

2. c. 2. Formation du pollen : 6

I. 2. D. LA POLLINISATION ET LA CROISSANCE DU TUBE POLLINIQUE : 10

2. d. 1. Les systèmes d'incompatibilité génétique : 10

2. d. 2. L'implication de l'eau dans la germination du pollen : 15

2. d. 3. L'implication des ions : 16

2. d. 4. Les différents signaux de guidage : 17

I. 2. E. LA CULTURE *IN-VITRO* DES TUBES POLLINIQUES : 20

I. 3. LA PAROI VÉGÉTALE : 22

I. 3. A. LA PAROI PRIMAIRE : 22

I. 3. B. LES PROTEINES PARIETALES : 23

3. b. 1. Les glycoprotéines riches en hydroxyproline (HRGP) : 23

3. b. 2. Les protéines riches en proline (PRP) : 30

I. 3. C. LES B-GLUCANES : 31

3. c. 1. La cellulose : 31

3. c. 2. La callose : 33

I. 3. D. LES HEMICELLULOSES : 36

I. 3. E. LES PECTINES : 38

3. e. 1. Le rhamnogalacturonane de type I (RG-I) : 39
3. e. 2. Le rhamnogalacturonane de type II (RG-II) : 40
3. e. 3. Le xylogalacturonane : 42
3. e. 4. Les homogalacturonanes : 43
I. 3. F. LES PROTEINES DE REMODELAGE DE LA PAROI : 45
3. f. 1. L'expansion cellulaire : remodelage des xyloglucanes et de la cellulose : 46
3. f. 2. Les pectines lyases : 48
3. f. 3. Les glycosides hydrolases : 48
I. 4. LES PECTINES MÉTHYLESTÉRASES : PMES 52
I. 4. A. STRUCTURE DES PMES : 52
I. 4. B. LES MODES D'ACTIONS DES PMES : 54
I. 4. C. LES DIFFERENTS GROUPES DE PME : 56
I. 4. D. LA REGULATION DES PMES PAR LES PMEIS : 59
4. d. 1. Les PMEIs : 59
4. d. 2. Les PMEIs / Inhibiteurs d'invertases : 62
I. 4. E. IMPLICATION DES PMES ET DES PMEIS DANS LE REMODELAGE DES HGS LORS DE LA CROISSANCE DU TUBE POLLINIQUE : 63

OBJECTIF DU SUJET DE RECHERCHE : 69

II. MATÉRIELS ET MÉTHODES 71

II.1. MATÉRIELS UTILISÉS : 71
II. 1. A. LE MATERIEL VEGETAL : 71
II. 1. B. LES SOUCHES BACTERIENNES : 71
Escherichia coli 71
Agrobacterium tumefaciens 71
II. 1. C. LES VECTEURS PLASMIDIQUES : 72
II. 2. MÉTHODOLOGIE EXPÉRIMENTALE DES CULTURES : 73
II. 2. A. CULTURE ET TRANSFORMATION DES PLANTES : 73
Stérilisation des graines : 73
Mise en culture des plantes : 73
Transformation des plantes avec *A. tumefaciens* par « *floral dip* » : 73
II. 2. B. RECOLTE ET CULTURE DU POLLEN : 74
Culture *in-vitro* du pollen en milieu liquide : 74
Culture *in-vitro* du pollen sur milieu solide : 74

Culture *in-vitro* du pollen en milieux modifiés : 75
Culture du pollen *in-vivo* : 75
Impact de la mutation sur les siliques et la production de graines : 76
II. 2. C. MANIPULATION DES SOUCHES BACTERIENNES : 76
Cultures bactériennes : 76
Transformation d'*E. coli* par choc thermique : 76
Transformation d'*A. tumefaciens* par choc thermique : 77
II. 3. BIOLOGIE MOLÉCULAIRE : 77
II. 3. A. EXTRACTION ET PURIFICATION D'ADN : 77
Extraction d'ADN génomique : 77
Extraction d'ADN plasmidique : 77
II. 3. B. ANALYSE DE L'ADN : 78
Amplification par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) : 78
Digestion enzymatique des produits de PCR et des plasmides : 78
Electrophorèse d'ADN : 78
Séquençage de l'ADN : 79
II. 3. C. ETUDE DE L'EXPRESSION DU PROMOTEUR DE LA PME48 : PRO_{PME48} 79
Clonage et purification de la séquence du promoteur du gène *PME48* : 79
Principe de la technique LIC et insertion dans le vecteur pPLV (LIC compatible) : 80
Obtention de l'expression stable chez *A. thaliana* : 82
Sélection des plantes transformées : 83
II. 3. D. SELECTION DES LIGNEES HOMOZYGOTES MUTANTES : 83
Amplification par PCR : 83
II. 3. E. ÉTUDE DE L'EXPRESSION DES GENES PAR QRT-PCR : 86
II. 4. MÉTHODOLOGIE EN IMAGERIE CELLULAIRE : 92
II. 4. A. ENRESINEMENT AU METHACRYLATE ET COUPE AU MICROTOME : 92
Le méthacrylate : 92
Coupes semi-fines : 93
II. 4. B. MARQUAGES CYTOCHIMIQUES : 93
Coloration GUS : 93
Coloration à l'aniline bleue des tubes polliniques *in-vivo* : 94
Test de viabilité au FDA (Fluorescein Di Acetate) : 94
II. 4. C. IMMUNOMARQUAGES : 95
Immunomarquage de surface : 95
Immunomarquage sur coupes semi-fines : 96
II. 4. D. MICROSCOPES, ACQUISITION ET TRAITEMENT D'IMAGES : 96

II. 5. ANALYSES BIOCHIMIQUES : 98
II. 5. A. EXTRACTION ET DOSAGE DES PROTEINES : 98
Dosage protéique : 98
II. 5. B. DOSAGE DE L'ACTIVITE PME : 98
II. 5. C. FOCALISATION ISOELECTRIQUE ET ZYMOGRAMME : 99
II. 5. D. ESTIMATION DU DEGRE DE METHYL-ESTERIFICATION DES HGS PAR SPECTROSCOPIE EN INFRA-ROUGE PAR TRANSFORMEE DE FOURRIER : 100
II. 6. ANALYSE *IN SILICO* ET TRAITEMENTS STATISTIQUES : 101
Analyse phylogénétique : 101
Statistiques : 102

III. RÉSULTATS 103

III. 1. ANALYSE DE L'EXPRESSION DES PMES DANS LES GRAINS DE POLLEN ET LES TUBES POLLINIQUES SAUVAGES: 103
III. 1. A. ANALYSES BIOINFORMATIQUES : 103
III. 1. B. ANALYSE DES NIVEAUX D'EXPRESSION DES *PMES* PAR RT-QPCR : 109
III. 1. C. CINETIQUE D'EXPRESSION DES PROMOTEURS : 111
Analyse de l'expression de PRO_{PPME1}, PRO_{PME48} et PRO_{PME23} avec le gène rapporteur *GUS* : 111
Analyse de l'expression du PRO_{PME48} avec le gène *sYFP* : 112
III. 2. SÉLECTION DES LIGNEES MUTANTES HOMOZYGOTES PAR PCR/RT-PCR : 113
III. 2. A. CRIBLAGE GENETIQUE DES MUTANTS *PME48-1 ET PME48-2* : 113
III. 2. B. CRIBLAGE GENETIQUE DE *PPME1 :* 115
III. 2. C. CRIBLAGE GENETIQUE DE *PME23-1* : 116
III. 3. CARACTERISATION DU MUTANT HOMOZYGOTE *PME48-1* : 117
III. 3. A. ANALYSES PHENOTYPIQUES ET BIOCHIMIQUES DU MUTANT HOMOZYGOTE *PME48-1* : 118
III. 3. B. ANALYSE PAR QRT-PCR DES TRANSCRITS DES 14 *PME*S SPECIFIQUES DU POLLEN CHEZ *PME48-1* : 137
III. 4. CARACTERISATION DES MUTANTS HOMOZYGOTES *PPME1, PME48-2* ET *PME23-1* : 139
III. 4. A. IMPACT DE LA MUTATION SUR LA FECONDATION ET LA PRODUCTION DE GRAINES : 139
Croissance *in-vivo* des tubes polliniques mutants : 139
Taille des siliques et production de graines : 140
III. 4. B. ANALYSES PHENOTYPIQUES DES GRAINS DE POLLEN MUTANTS : 141
La viabilité des grains de pollen *ppme1* est sensiblement la même que celle du pollen sauvage : 141
Le nombre de noyaux dans les grains de pollen mutants est conforme à celui du pollen sauvage : 142
La longueur des grains de pollen secs est plus petite chez les mutants : 143

Les grains de pollen mutants présentent un retard de germination *in-vitro* dépendant du type de milieu de culture : 143
Les tubes polliniques des mutants *pme48*, *ppme1* et *pme23* sont instables : 145
L'imbibition des grains de pollen *ppme1* est perturbée : 146
Les taux de germination des grains de pollen *ppme1* sont améliorés en augmentant la concentration en $CaCl_2$ dans le MG : 148
III. 4. C. ETUDES IMMUNOCYTOCHIMIQUES DES GRAINS DE POLLEN ET DES TUBES POLLINIQUES *PPME1* ET *PME23-1* : 149
Immunomarquages des HGs fortement méthyl-estérifiés avec LM20 : 149
III. 4. D. ANALYSE PAR QRT-PCR DES TRANSCRITS DES 14 *PME*S CHEZ *PPME1*: 151
III. 5. EFFET DE L'AJOUT EXOGENE DE PME ET PMEI SUR LA GERMINATION ET LA CROISSANCE DES TUBES POLLINIQUES : 153
III. 5. A. UTILISATION DE LA PME D'ORANGE : 153
III. 5. B. UTILISATION DU PMEI DE KIWI : 156

IV : DISCUSSION, CONCLUSION ET PERSPECTIVES : 159

V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 169

ANNEXE 1 203

A. ALIGNEMENT DES SEQUENCES D'ADN DE *PME48* ET *PPME1* : 203
B. ALIGNEMENT DES SEQUENCES PROTEIQUES DE PME48 ET PPME1 AVEC LA PME D'ORANGE : 204
ALIGNEMENT DE PPME1 ET DE LA PME ORANGE : 204
ALIGNEMENT PME48 ET DE LA PME ORANGE : 204

ANNEXE 2 205

ENZYMES DE RESTRICTIONS UTILISEES DANS CETTE ETUDE : 205
AMORCES UTILISEES DANS CETTE ETUDE : 205

ANNEXE 3 206

ANALYSES MOLECULAIRES DE L'INSERTION DE L'ADN-T DANS LES MUTANTS : 206
LE MUTANT *PPME1* : 206
Séquence d'ADN génomique de *PPME1* : 206
ppme1 : 207

LE MUTANT *PME23-1* : 208
Séquence d'ADN génomique de *PME23* : 208
pme23-1 : 208
LES MUTANTS *PME48-1* ET *PME48-2* : 209
Séquence d'ADN génomique de *PME48* : 209
pme48-1 : 210
pme48-2 : 210

ANNEXE 4 **212**

ANNEXE 5 **213**

LISTE DES PUBLICATIONS : 213
PRESENTATIONS ORALES ET POSTERS DANS DES CONGRES : 269
PRESENTATIONS ORALES EN ANGLAIS : 269
POSTERS : 269
CV : 278

Liste des Abréviations

3,4-DHP : 3,4-déhydro-L proline
ADNc : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
ADN-T : ADN de transfert
AGP : ArabinoGalactane Protéine
Amp : Ampiciline
Ara : Arabinose
ARNm : Acide RiboNucléique messager
ARNt : Acide RiboNucléique totaux
Arg : Arginine
Asn : Asparagine
Asp : Acide aspartique
BET : Bromure d'EThidium
βGAL : β-galactosidase
BLAST : Basic Local Alignment Search Tool
BSA : Bovin Serum Albumin
CAZy : Carbohydrate-Active enZyme
CDM1 : CALLOSE DEFECTIVE MICROSPORE 1
CDS : « Coding DNA Sequence »
CESA : CELLULOSE SYNTHASE
CIF : INHIBITEUR D'INVERTASE
CKS : CMP:Kdo SYNTHETASE
Col *O* : Ecotype Columbia *O*
CPC : Cross-pollen compatibility response
CSLD : CELLULOSE SYNTHASE LIKE-D
C-term : Région en C-terminale d'une protéine
DCB : 2,6-dichlorobenzonitrile
D-gal : D-galactose
Dha : Acide 2-céto-3-désoxy-D-*lyxo*-heptulosonique
DM : Degré de méthyl-estérification
dNTP : Désoxynucléotide 5' triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
D-Ser : D-sérine
EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétique acide
EFD : EXINE FORMATION DEFECT
EGTA : Ethylène glycol tétra acétique acide
EPG : ENDO-α-(1,4)-POLYGALACTURONASE
EXLA : EXPANSINE-LIKE A
EXLB : EXPANSINE-LIKE B
EXP : EXPANSINE
EXPA : EXPansine A
EXPB : EXPansine B
FDA : Fluorescein Di Acetate
FER : FERONIA
FITC : Isothiocyanate de fluorescéine
FLA : fasciclin-like AGP
FTIR : Fourier transform infra-red
Fuc : Fucose
GABA : Acide Gamma-AminoButyrique

Gal : Galactose
GalA : Acide Galacturonique
GATL : GALACTURONOSYL TRANSFERASE-LIKE
GAUT : GALACTURONOSYL TRANSFERASE
GAX : GlucuronoArabinoXylane
GC-MS : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
genta : gentamicine
GH : GLYCOSIDES HYDROLASE
Glc : Glucose
GlcA : Acide Glucuronique
Glu : Acide glutamique
Gly : Glycine
gme : mutant pour la GDP-d-mannose 3, 5-epimérase
gp : grain de pollen
GPI : GlycosylPhosphatidylInositol
GT : GLYCOSYLTRANSFERASE
HG : HomoGalacturonane
His : Histidine
HRGP : GlycoProtéine Riche en Hydroxyproline
Hyp : Hydroxyproline
IRX10 : IRREGULAR XYLEM 10
IRX10-L : IRREGULAR XYLEM 10-LIKE
JIM5/7 : John Innes Monoclonal5/7 spécifiques des HGs
Kana : Kanamicyne
Kdo : Acide 2-céto-3-désoxy-D-*manno*-octulosonique
kor : mutant *korrigan*
L-ara : L-arabinose
LB : Lysogeny-Broth
LBb1.3 : Left border primer salk 1.3
LIC : Ligation-Independent Cloning
LM19/20 : Leeds Monoclonal19/20 spécifiques des HGs
LRX1 : LEUCINE-RICH REPEAT/EXTENSIN 1
Lys : Lysine
MGL : Milieu de Germination Liquide
MGS : Milieu de Germination Solide
MS1 : MALE STERILE 1
MS188 : MALE STERILE 188
MS : milieu Murashige and Skoog
NASC : Nottingham Arabidopsis Stock Centre
*Na*StEP : *Nicotiana alata* Stigmata Expressed Protein
NIP : NODULIN26-LIKE-INTRINSIC PROTEIN
NO : oxide nitrique
*Np*GUT1 : *Nicotiana plumbaginifolia* GLUCURONOSYL TRANSFERASE 1
NTA : récepteur NORTIA
Nt-CIF : INHIBITEUR D'INVERTASE chez *Nicotiana tabacum*
N-term : Région en N-terminale d'une protéine
PAG : AGP chimérique de type PLASTOCYANINE
PBS : Phosphate buffered saline
PCR : Réaction de polymérisation en chaîne (*polymérase chain reaction*)
PEX1 : POLLEN EXTENSIN-LIKE 1
PGase : POLYGALACTURONASE

Phe : Phénylalanine
pI : point Isoélectrique
PI : Propidium Iodine
PIP : PLASMA MEMBRANE-INTRINSIC PROTEIN
PL : PECTATE LYASE
PLC : PHOSPHOLIPASE C
PLD : PHOSPHOLIPASE D
PLL : PECTINE LYASE-LIKE
PM : Processing motif, domaine de clivage des PMEs
PME : PECTINE METHYL-ESTERASE
PME-PMEI : Complexe d'une PME avec son inhibiteur PMEI
PMEI : INHIBITEUR DE PECTINE METHYL-ESTERASE
POP2 : POLLEN-PISTIL-INTERACTION 2
PP : POLLEN PROTEIN
PRIMACEN : Plate-forme de Recherche en IMAgerie CEllulaire de haute-Normandie
PRP : PROTEINE RICHE en Pro
Pro : Proline
PRO$_{PME23}$: région Promotrice du gène *PME23*
PRO$_{PME48}$: région Promotrice du gène *PME48*
PRO$_{PPME1}$: région Promotrice du gène *PPME1*
PRO-région : Région en N-term d'une PME de groupe II
qPCR : PCR quantitative en temps réel
RGAP : Rice Genome Annotation Project
RG I : Rhamnogalacturonane de type I
RG II : Rhamnogalacturonane de type II
RGP : REVERSIBLY GLYCOSYLATED PEPTIDE
Rha : Rhamnose
Rif : Rifampicine
ROS : Reactiv Oxygen Species
rpm : rotations par minute
RT-PCR : Reverse Transcriptase - PCR
SBT : SUBTILASE
SCF : SKP1/Cullin1/F-box
SCR/SP11 : S-locus Cysteine-Rich / S-locus Protein 11
SDS : Sodium Dodécyl Sulfate
Ser : Sérine
SER1 : Ser RACEMASE 1, enzyme capable de convertir la L-ser en D-ser
SI : Self-Incompatibility
SIA : SIALYL TRANSFERASE
sia2 : mutant sialyltransferase-like 2
SIP : SMALL ANS BASIC MEMBRANE-INTRINSIC PROTEIN
SLF : S-Locus F-box
SLG : S-LOCUS GLYCOPROTEIN
SOC : milieu Super Optimal broth with Catabolite repression
SP : Signal Peptide
SPI : Self Pollen Incompatibility response
SRK : S-LOCUS RECEPTOR KINASE
S-RNase : RIBONUCLEASE de la famille T2, codée par le gène S
SS : PRO-Région (inhibiteur de PME ou inhibiteur d'invertase)
sYFP : super YELLOW FLUORESCENT PROTEIN
TBE : Tris Borate EDTA

tétra : tétracycline
Thr : Thréonine
TIP : TONOPLAST_INTRINSIC PROTEIN
TM : TransMembrane domain
Tm : Température de fusion ou d'hydridation des amorces
Trp : Tryptophane
tt : tissus de transmission
Tyr : Tyrosine
UTR : UnTranslated Region, région du gène non traduite
UV : lumière ultra-violette
Val : Valine
VGD : VANGUARD
VGDH : VANGUARD Homolog
v/v : volume/volume
WT : sauvage (wild type)
XCIF-PMEI : version chimère de PMEI constituée du domaine central du PMEI fusionné à l'extension N-term du CIF
XEH : XyG ENDO-HYDROLASE
XET : XyG ENDO-TRANSGLUCOSYLASE
XG : XyloGalacturonane
xgd1 : mutant *xylogalacturonan deficient 1*
XPMEI-CIF : version chimère de PMEI constituée de l'extension N-term du PMEI fusionnée au domaine central du CIF
XTH : XyG ENDO-TRANSGLUCOSYLASE HYDROLASE
XyG : Xyloglucane
*Zm*EA1 : *Zea mays* EGG APPARATUS 1

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : HETEROGENEITE MORPHOLOGIQUE DES FLEURS. 2
FIGURE 2 : L'ORCHIDEE *OPRHYS SCOLOPAX* (A) EMET UN PARFUM QUI RESSEMBLE A L'HORMONE SEXUELLE FEMELLE D'UNE D'ABEILLE SOLITAIRE. 2
FIGURE 3 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTS STYLES. 4
FIGURE 4 : CYCLE DE REPRODUCTION SEXUEE DES ANGIOSPERMES 5
FIGURE 5 : PRINCIPALES ETAPES ABOUTISSANT A LA FORMATION DU POLLEN MATURE CHEZ *A. THALIANA* (D'APRES MOLLET *ET AL.,* 2007). 7
FIGURE 6: MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE ET SCHEMAS D'UN GRAIN DE POLLEN SAUVAGE CHEZ *A. THALIANA*. 9
FIGURE 7 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'AUTO-INCOMPATIBILITE GENETIQUE DU POLLEN (D'APRES TOURTE *ET AL.,* 2005). 11
FIGURE 8 : MODELES DU REJET GAMETOPHYTIQUE INDUIT PAR LES S-RNASES. 14
FIGURE 9 : REPRESENTATIONS DE LA ZONE CLAIRE ET DE L'APEX DU TUBE POLLINIQUE CHEZ LE LYS SUIVIES D'UN SCHEMA DE L'APEX D'UN TUBE POLLINIQUE AVEC REPRESENTATION DE LA ZONE CLAIRE. 17
FIGURE 10 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA PAROI D'UNE CELLULE VEGETALE (D'APRES SMITH, 2001). 23
FIGURE 11 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE STRUCTURES PUTATIVES DES DIFFERENTES CLASSES D'AGP CHEZ *A. THALIANA* (D'APRES SCHULTZ *ET AL.,* 2000 ET SHOWALTER *ET AL.,* 2010). 28
FIGURE 12 : MODELISATION D'UN MOTIF DE CELLOBIOSE. 31
FIGURE 13 : LA FORMATION DE LA MICROFIBRILLE DE CELLULOSE PAR LES CELLULOSE SYNTHASES. 32
FIGURE 14 : SCHEMA DE PRINCIPE DU PROCESSUS DE SECRETION DANS DES TUBES POLLINIQUES. 35
FIGURE 15 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES PRINCIPAUX MOTIFS DE XYGS ET LEURS NOMENCLATURES D'APRES DARDELLE *ET AL.* (2015). 37
FIGURE 16 : IMMUNOMARQUAGES DES EPITOPES ASSOCIES AUX XYGS NON FUCOSYLES (MOTIF XXXG) ET FUCOSYLES AVEC LES ANTICORPS LM15 AND CCRC-M1, RESPECTIVEMENT. D'APRES DARDELLE *ET AL.* (2010). 38
FIGURE 17 : STRUCTURE DES PRINCIPAUX CONSTITUANTS DES PAROIS DE TYPE I ET VUE DE DETAIL DES POLYSACCHARIDES PECTIQUES MAJEURS. 39
FIGURE 18 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA STRUCTURE "BOITE-A-ŒUFS"; PLUSIEURS CHAINES D'HGS PEUVENT INTERAGIR PAR DES IONS Ca^{2+} (VINCKEN *ET AL.,* 2003). 43
FIGURE 19 : IMMUNOMARQUAGES DE TUBES POLLINIQUES D'*A.THALIANA* CULTIVES *IN-VITRO* DURANT 6 H. 44
FIGURE 20 : MODELE PRESENTANT LE DEPOT DES PRINCIPAUX POLYSACCHARIDES DANS LA PAROI CELLULAIRE DU TUBE POLLINIQUE ET SON REMODELAGE POSSIBLE AVEC LES PROTEINES PROVENANT DU TUBE POLLINIQUE OU DU PISTIL. 46
FIGURE 21 : ALIGNEMENTS DES SEQUENCES D'ACIDES AMINES PROVENANT DES SEGMENTS CONSERVES DE 70 PMES ISSUES DE PLANTES, CHAMPIGNONS ET BACTERIES ET MONTRANT LES ACIDES AMINES CONSERVES (D'APRES MARKOVIC ET JANECEK, 2004). 53
FIGURE 22 : STRUCTURES TRIDIMENSIONNELLES DE DIFFERENTES PMES OBTENUES PAR CRISTALLOGRAPHIE. 54
FIGURE 23 : REACTION DE DE-METHYLESTERIFICATION DES CHAINES DES HGS METHYL-ESTERIFIES CATALYSEE PAR LES PMES (D'APRES JOLIE *ET AL.,* 2010). 55
FIGURE 24 : MODES D'ACTION DES PMES. 56
FIGURE 25 : LES DIFFERENTS GROUPES DE PMES ET LEURS STRUCTURES TRIDIMENSIONNELLES (D'APRES PELLOUX *ET AL.,* 2007). 57
FIGURE 26 : SCHEMA REPRESENTANT LA CO-SECRETION HYPOTHETIQUE DES PMES DU GROUPE II ET DES HGS DE L'APPAREIL DE GOLGI ET DES VESICULES GOLGIENNES JUSQU'A LA PAROI. 58
FIGURE 27 : STRUCTURES TRIDIMENSIONNELLES DES PMEIS DE KIWI ET D'*A. THALIANA.* 60
FIGURE 28 : STRUCTURE DU COMPLEXE PME DE TOMATE (BLEU-VERT) -PMEI DE KIWI (D'APRES DI MATTEO *ET AL.,* 2005). 61
FIGURE 29 : EFFET DU PH SUR L'ACTIVITE DES PMES (D'APRES BOSCH ET HEPLER, 2005). 64
FIGURE 30 : EXPRESSION DES PMES DANS L'ENSEMBLE DES TISSUS CHEZ *A. THALIANA*. 66
FIGURE 31 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA TECHNIQUE LIC AINSI QUE DES PLASMIDES PPLV (D'APRES DE RYBEL *ET AL.,* 2011). 72

FIGURE 32 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE EXPLIQUANT LA SELECTION DES LIGNEES HOMOZYGOTES. 83
FIGURE 33 : PRINCIPE DE LA QRT-PCR AVEC LE *SYBR® GREEN*. 89
FIGURE 34 : SCHEMA REPRESENTANT LE SEUIL DE FLUORESCENCE DETECTABLE NOMME CROSSING POINT (CP) D'APRES LARIONOV *ET AL.,* 2005. 89
FIGURE 35 : SCHEMA REPRESENTANT L'ACTION DES ESTERASES D'UNE CELLULE VIVANTE AVEC LE FDA, PERMETTANT AINSI L'ESTIMATION DE LA VIABILITE. 95
FIGURE 36 : ARBRE PHYLOGENETIQUE DES 66 *PME*S D'*A. THALIANA,* CONSTRUIT A PARTIR DES ALIGNEMENTS DES SEQUENCES D'ADN OBTENUS PAR CLUSTALW, ET GENERE EN UTILISANT LA METHODE DU *NEIGHBOUR-JOINING*. 104
FIGURE 37 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES SEQUENCES GENOMIQUES DE *PME48* ET *PPME1*. 107
FIGURE 38 : ALIGNEMENT DES SEQUENCES EN ACIDES AMINES DE PPME1 ET PME48. 108
FIGURE 39 : ANALYSE DES NIVEAUX D'EXPRESSION DES TRANSCRITS DES *PME*S SPECIFIQUES DU POLLEN PAR RT-QPCR DANS DES GRAINS DE POLLEN SECS (A), APRES UNE HEURE D'IMBIBITION (B) ET DANS DES TUBES POLLINIQUES CULTIVES PENDANT 6 H EN MGL (C). 110
FIGURE 40 : ANALYSE DE L'EXPRESSION DES PROMOTEURS DE PME48 (A, B, C), PPME1 (D, E, F) ET PME23 (G). 111
FIGURE 41 : ANALYSE DE L'EXPRESSION DU PROMOTEUR PRO_{PME48}. 112
FIGURE 42 : SCHEMA REPRESENTANT LE GENE *PME48* AVEC LA POSITION DE L'INSERTION D'ADN-T POUR LE MUTANT *PME48-1* (SALK_122970) AINSI QUE LA POSITION DES AMORCES UTILISEES. 114
FIGURE 43 : SCHEMA REPRESENTANT LE GENE *PME48* AVEC LA POSITION DE L'INSERTION D'ADN-T POUR LE MUTANT *PME48-2* (SALK_007330) AINSI QUE LA POSITION DES AMORCES UTILISEES. 114
FIGURE 44 : IDENTIFICATION DE *PME48-1* ET *PME48-2* PAR MIGRATION DES PRODUITS PCR ET VERIFICATION DE L'EXPRESSION DES TRANSCRITS CHEZ *PME48-1* PAR RT-PCR. 115
FIGURE 45 : SCHEMA REPRESENTANT LE GENE *PPME1* AVEC LA POSITION DE L'INSERTION D'ADN-T POUR LE MUTANT *PPME1* AINSI QUE LA POSITION DES AMORCES UTILISEES. 116
FIGURE 46 : IDENTIFICATION DU MUTANT *PPME1* PAR PCR SUR ADNG ET VERIFICATION PAR RT-PCR. 116
FIGURE 47 : SCHEMA REPRESENTANT LE GENE *PME23* AVEC LA POSITION DE L'INSERTION D'ADN-T POUR LE MUTANT *PME23-1* AINSI QUE LA POSITION DES AMORCES UTILISEES. 117
FIGURE 48 : IDENTIFICATION DU MUTANT *PME23-1* PAR PCR SUR ADNG. 117
FIGURE 49 : EXPRESSION RELATIVE DE CHAQUE *PME* CHEZ *PME48-1* (*PME48-1*/SAUVAGE) OBTENUE PAR QRT-PCR SUR LES GRAINS DE POLLEN SECS (A), LES GRAINS DE POLLEN IMBIBES DURANT 1 H (B) ET LES TUBES POLLINIQUES CULTIVES PENDANT 6 H (C) DANS DU MGL. 138
FIGURE 50 : COMPARAISON DE LA PROGRESSION DES TUBES POLLINIQUES SAUVAGES (A), *PPME1* (B), *PME48-2* (C) ET *PME23-1* (D) DANS DES PISTILS SAUVAGES, 6 H APRES LA POLLINISATION MANUELLE. 140
FIGURE 51 : COMPARAISON DE LA LONGUEUR MOYENNE (CM) DES SILIQUES (HISTOGRAMME) ET DU NOMBRE MOYEN DE GRAINES PAR SILIQUE CHEZ LES PLANTES SAUVAGES ET MUTANTES *PPME1*, *PME48-2* ET *PME23-1* (TABLEAU). 141
FIGURE 52 : PHOTOGRAPHIES DES GRAINS DE POLLEN SAUVAGES (A, B) ET MUTANTS *PPME1*(C, D), APRES COLORATION A LA FDA, EN LUMIERE TRANSMISE (B, D) ET SOUS UV (A, C). 142
FIGURE 53 : COLORATION AU DAPI DE GRAINS DE POLLEN SAUVAGES (A) ET MUTANTS : *PPME1* (B), *PME48-2* (C) ET *PME23-1* (D). 142
FIGURE 54 : COMPARAISON DE LA LONGUEUR MOYENNE DES GRAINS DE POLLEN SECS SAUVAGES AVEC CELLE DES GRAINS DE POLLEN SECS MUTANTS *PME48-2*, *PPME1* ET *PME23-1*. 143
FIGURE 55 : CINETIQUE DE GERMINATION DES GRAINS DE POLLEN SAUVAGES ET MUTANTS CULTIVES *IN-VITRO* EN MGL. 144
FIGURE 56 : CINETIQUE DE GERMINATION DES GRAINS DE POLLEN SAUVAGES ET MUTANTS CULTIVES *IN-VITRO* SUR MGS. 145
FIGURE 57 : PHOTOGRAPHIES PAR *TIME LAPSE* DE GRAINS DE POLLEN SAUVAGES ET *PPME1* CULTIVES EN MGL. 146
FIGURE 58 : CINETIQUE D'ECLATEMENT DES TUBES POLLINIQUES CULTIVES EN MGL CHEZ LE SAUVAGE (WT) ET LES MUTANTS *PPME1*, *PME48-1, PME48-2* ET *PME23-1*. 146
FIGURE 59 : CINETIQUE D'IMBIBITION DES GRAINS DE POLLEN SAUVAGES ET MUTANTS *PPME1* ET *PME48-1* CULTIVES SUR MGS (A) OU DANS DU MGL (B). 147
FIGURE 60 : CINETIQUE DE GERMINATION ET D'ECLATEMENT DES GRAINS DE POLLEN SAUVAGES ET MUTANTS (*PPME1* ET *PME23-1*) CULTIVES *IN-VITRO* DANS DU MGL (A, C) OU SUR MGS (B, D) DONT LA CONCENTRATION EN $CaCl_2$ EST DE 7,5 MM (A, B) OU DE 10 MM (C, D). 149

FIGURE 61 : IMMUNOMARQUAGES DE SURFACE DES EPITOPES ASSOCIES AUX HGS FORTEMENT METHYL-ESTERIFIES AVEC JIM7 ET LM20, OU FAIBLEMENT METHYL-ESTERIFIES AVEC JIM5 ET LM19, SUR DES GRAINS DE POLLEN ET TUBES POLLINIQUES SAUVAGES (WT) ET MUTANTS (*PPME1*; *PME48-1* ET *PME23-1*). 150
FIGURE 62 : EXPRESSION RELATIVE DES 14 *PMES* CHEZ *PPME1* OBTENUE PAR QRT-PCR SUR LES GRAINS DE POLLEN SECS (A), LES GRAINS DE POLLEN IMBIBES DURANT 1 H (B) ET LES TUBES POLLINIQUES CULTIVES PENDANT 6 H (C) DANS DU MGL. 152
FIGURE 63 : TAUX DE GERMINATION ET D'ECLATEMENT DES TUBES POLLINIQUES SAUVAGES (A) OU MUTANTS *PPME1* (B) ET *PME48-1* (C), EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN PME D'ORANGE DANS LE MGL (DE 0,01 A 20 $U.mL^{-1}$ DE PME PAR ML DE MGL), APRES 6 H DE CULTURE *IN-VITRO*. 154
FIGURE 64 : COMPARAISON DES TAUX DE GRAINS DE POLLEN, SAUVAGES (VERT FONCE) OU MUTANTS *PPME1* (VERT OLIVE) ET *PME48-1* (VERT CLAIR), AYANT DEUX TUBES POLLINIQUES EMERGEANT D'UN SEUL GRAIN DE POLLEN (PHENOTYPE DE DOUBLE GERMINATION). 155
FIGURE 65 : EFFET DU PMEI DE KIWI SUR LA GERMINATION DES GRAINS DE POLLEN ET LA CROISSANCE DES TUBES POLLINIQUES D'*A. THALIANA* DANS DES MGL CONTENANT 0 (CONTROLE), 4, 10 ET 20 µM DE PMEI (GRAPHIQUE SUPERIEUR). 157
FIGURE 66 : ESTIMATION DE LA DISPONIBILITE EN Ca^{2+} AU COURS DE L'IMBIBITION ET DE LA GERMINATION DU POLLEN D'*ARABIDOSPIS* CULTIVE *IN-VITRO* SUR MILIEU SOLIDE OU EN MILIEU LIQUIDE. 162
FIGURE 67 : MESURE DE LA RIGIDITE APPARENTE DES TUBES POLLINIQUES SAUVAGES ET *PME48* CULTIVES EN MILIEU LIQUIDE PAR « CELLULAR FORCE MICROSCOPY ». 164
FIGURE 68 : REPRESENTATION DE L'IMPLICATION DES IONS CALCIQUES A L'APEX DU TUBE POLLINIQUE, A) DANS LA ZONE CLAIRE (CLEAR ZONE, D'APRES STEINHORST ET KUDLA, 2013) ET B) DURANT L'EXPANSION DE LA PAROI (D'APRES HEPPLER *ET AL.*, 2012). 165
FIGURE 69 : ALIGNEMENTS *VIA* CLUSTALW2 DES SEQUENCES D'ADNC DE AT1G69940 ET AT5G07410, CODANT RESPECTIVEMENT POUR LA PME48 ET LA PPME1 (A), ET DES SEQUENCES NON TRADUITES 3'UTR ET 5'UTR (RESPECTIVEMENT PRESENTES EN B ET C). 203
FIGURE 70 : GELS CORRESPONDANTS AU CRIBLAGE DES COLONIES D'*E.COLI* RECOMBINANTES (A ET B) ET A UNE DIGESTION CONTROLE DU PLASMIDE PAR L'ENZYME *BAMH*I (C). 212

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : LISTE DES AMORCES POUR LA CONSTRUCTION PLASMIDIQUE. LES SEQUENCES ADAPTATRICES LIC SONT SURLIGNEES EN VERT. 79
TABLEAU 2 : NOM DU PLASMIDE UTILISE, SON UTILISATION, SES CARACTERISTIQUES, AINSI QUE LES SEQUENCES DES ADAPTATEURS POUR LES AMORCES *FORWARD* ET *REVERSE* (D'APRES DE RYBEL *ET AL.,* 2011). 80
TABLEAU 3 : COMPOSITION DU MILIEU REACTIONNEL POUR LA LINEARISATION PAR *HPA*I. 81
TABLEAU 4 : COMPOSITION DU MILIEU REACTIONNEL POUR LES TRAITEMENTS A LA T4 ADN POLYMERASE. 81
TABLEAU 5 : LISTE DES AMORCES UTILISEES POUR LE GENOTYPAGE DES MUTANTS D'INSERTIONS. 84
TABLEAU 6 : COMPOSITION DU MILIEU REACTIONNEL POUR LA PCR SEMI-QUANTITATIVE. 85
TABLEAU 7 : CONDITIONS DU THERMOCYCLEUR. 85
TABLEAU 8 : LISTE DES AMORCES UTILISEES POUR LA PCR SEMI-QUANTITATIVE SUR ADNC. 87
TABLEAU 9 : LES DIFFERENTES ETAPES DU PROGRAMME UTILISEES POUR LA QRT-PCR. 90
TABLEAU 10 : COMPOSITION DU MILIEU REACTIONNEL POUR LA QRT-PCR : 90
TABLEAU 11 : LISTE DES DIFFERENTS COUPLES D'AMORCES UTILISES POUR LA QRT-PCR. 91
TABLEAU 12 : LISTE DES ANTICORPS MONOCLONAUX DIRIGES CONTRE LES EPITOPES ASSOCIES AUX HGS. 96
TABLEAU 13 : TABLEAU DES COMPOSANTS DU GEL D'IEF. 99
TABLEAU 14 : NIVEAUX D'EXPRESSION DES 14 *PME*S SPECIFIQUES DU POLLEN D'APRES LES DONNEES DE TRANSCRIPTOMIQUE DANS E-FP BROWSER. 106

I. INTRODUCTION

I. 1. INTRODUCTION GÉNÉRALE :

Les plantes à fleurs (Angiospermes) sont aujourd'hui dominantes dans tous les environnements, mais cela n'a pas toujours été le cas. L'angiosperme vivante la plus primitive est *Amborella trichopoda*, qui serait apparue il y a 135 millions d'années (Endress and Igersheim, 2000). Elle a été découverte, nommée et décrite pour la première fois en 1869 par le botaniste français Baillon (Baillon, 1869). Au Crétacé supérieur, la végétation change d'aspect : l'ancienne flore à ptéridophytes (ex : fougères) et à gymnospermes (ex : les conifères), typique du Jurassique et du Crétacé inférieur, est progressivement remplacée par une végétation où dominent les angiospermes. Celles-ci ont conquis l'Europe en trois phases s'étalant sur plus de 40 millions d'années (Coiffard *et al.,* 2012). Les espèces se sont ensuite diversifiées rapidement. Les angiospermes dominent aujourd'hui largement la flore dans le monde entier avec environ 250 000 espèces, soit 70% des végétaux connus. Soixante-quinze pour cent d'entre eux sont hermaphrodites : la fleur est bisexuée et possède à la fois la partie mâle et la partie femelle.

Les fleurs sont les organes de la plante servant à la reproduction. C'est une étape clé du cycle de développement des plantes car elle aboutit à la production de graines permettant la pérennisation de l'espèce. Les fleurs sont extrêmement hétérogènes d'une espèce à l'autre. Par exemple, la taille peut varier de 1 m de diamètre (*Rafflesia arnoldii*, rafflésie plante parasite découverte en 1818 en forêt tropicale d'Indonésie par le naturaliste britannique Joseph Arnold ; Figure 1) jusqu'à 0,25 mm (*Wolffia arrhiza*, lentille d'eau originaire du Brésil découverte dans les années 1850 par le naturaliste français Weddell). Outre la taille qui les différencie, les couleurs, les formes ainsi que les odeurs peuvent être aussi très surprenantes. Ainsi, la rafflésie dégage une odeur de viande en décomposition qui attire des diptères et facilite la pollinisation.

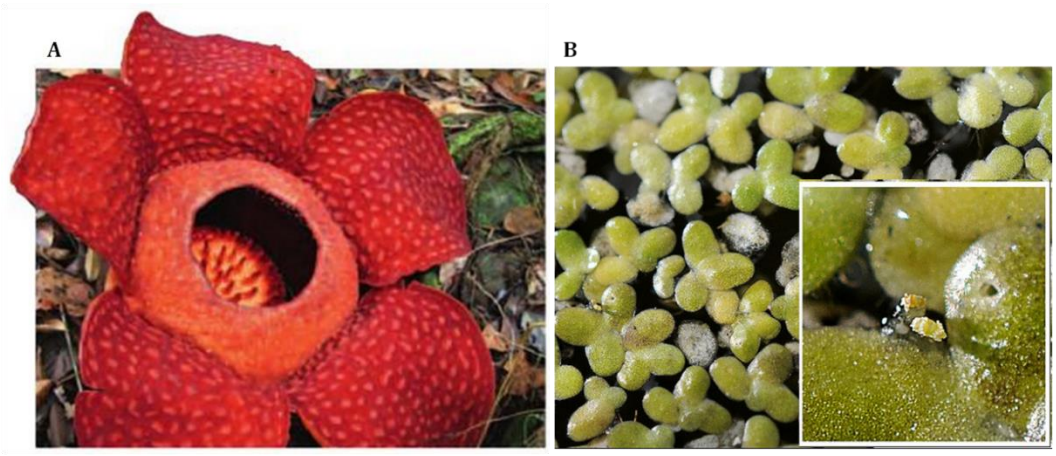


Figure 1 : Hétérogénéité morphologique des fleurs.
A) La rafflésie dont les fleurs sont les plus grandes connues à ce jour (1 m de diamètre) sont des plantes qui ont perdu leurs chlorophylles et parasitent d'autres plantes. B) Les fleurs des lentilles d'eau (*Lemna minor*) sont les plus petites d'Europe (1 mm de diamètre) connues à ce jour. (Hallé F, 2012 ; http://www.flickr.com/photos/gjshepherd/2951671000/)

Certaines orchidées sont également très impressionnantes. Les ophrys par exemple, sont principalement pollinisées par des abeilles mâles sauvages (Figure 2) car ses fleurs dégagent une odeur très proche des phéromones sexuelles femelles. La pseudo-copulation de l'abeille mâle sur le labelle (lèvre inférieure) de la fleur et les mouvements associés entrainent le dépôt des pollinies (petits globules contenant le pollen) sur la tête ou l'abdomen de l'animal.

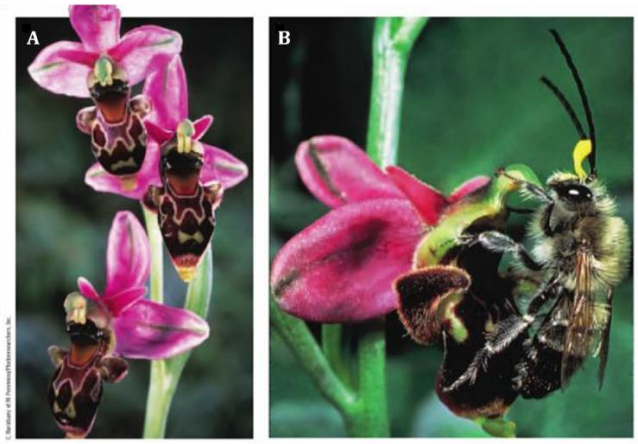


Figure 2 : L'orchidée *Oprhys scolopax* (A) émet un parfum qui ressemble à l'hormone sexuelle femelle d'une d'abeille solitaire.
De plus, la couleur et la forme de la fleur lui donneraient l'aspect d'une abeille. Les mâles se laissent abuser et tentent de s'accoupler avec les fleurs (B), se couvrant du pollen qu'ils transportent à une autre fleur (D'après Pichersky, 2012).

I. 2. LA REPRODUCTION SEXUÉE :

I. 2. a. Anatomie de la fleur :

La fleur est une structure complexe portant les organes reproducteurs : l'androcée est la partie mâle de la fleur, elle est composée d'étamines. Les étamines sont composées d'un filet surmonté d'anthères dans lesquelles les grains de pollen seront formés puis libérés une fois arrivés à maturité. Le gynécée ou pistil est la partie femelle de la fleur et comporte un ou plusieurs carpelles. Ce carpelle est composé de l'ovaire, d'un style surmonté d'un stigmate qui est le réceptacle sur lequel le pollen mature germera.

Les structures des stigmates et des styles varient selon les espèces et peuvent être classées en plusieurs catégories (Allen *et al.,* 2010). Chez *Arabidopsis thaliana (A. thaliana)*, les stigmates sont secs, et possèdent à la surface des papilles une fine pellicule hydratée de protéines, de glycoprotéines et de lipides (Tung *et al.,* 2005 ; Allen *et al.,* 2010 ; Lehner *et al.,* 2010). Tandis que chez le tabac ou la tomate, les stigmates humides sécrètent une abondante quantité d'exsudats hydrophiles riches en sucre ou d'exsudats riches en lipides, jouant un rôle prépondérant pour diriger le tube pollinique en croissance (Mollet *et al.,* 2007). Il existe également les stigmates semi-secs (stade intermédiaire entre les stigmates secs et humides).

Les styles peuvent être creux ou pleins. *A. thaliana*, le tabac ou la tomate possèdent un style plein (Figure 3 A). Celui-ci est constitué de cellules spécialisées formant le tissu de transmission dans lequel les tubes polliniques se développent de façon intrusive (Lord, 2000). Le lys possède un style creux (Figure 3 B). Celui-ci est constitué d'un canal bordé par l'épiderme du tissu de transmission. Un exsudat est sécrété permettant entre autres le guidage et l'adhésion des tubes polliniques (Mollet *et al.,* 2000 ; Lord, 2001).

Autour de ces organes reproducteurs se trouvent la corolle, ensemble des pétales, et le calice, ensemble des sépales formant une enveloppe protégeant la corolle, généralement de couleur verte.

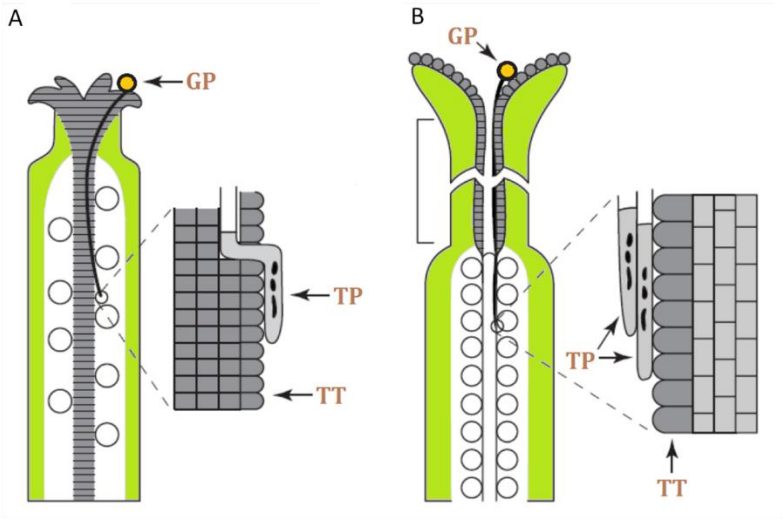


Figure 3 : Représentation schématique des différents styles.
(A) Style plein chez *A. thaliana* et (B) style creux chez le lys. (D'après Lord, 2000). GP : Grain de pollen, TP : Tube pollinique, TT : Tissu de transmission.

I. 2. b. La double fécondation chez les angiospermes :

Chez les angiospermes comme *A. thaliana*, la reproduction sexuée commence par la pollinisation au cours de laquelle les gamétophytes mâles ou grains de pollen adhèrent aux papilles du stigmate (Zinkl *et al.,* 1999) (Figure 4). La réhydratation des grains de pollen sur le stigmate due à l'absorption de l'eau permet la germination du grain. Durant cette hydratation des grains de pollen, les vacuoles turgescentes poussent le cytoplasme vers une des trois apertures du grain de pollen permettant la rupture de l'intine et/ou de l'exine : c'est le début de la croissance du tube pollinique (Lord et Russell, 2002).

Un tube pollinique se développe et croît à travers le tissu de transmission du style afin d'aller féconder les ovules. Pour cela, les tubes pénètrent la paroi des papilles, entrent dans le style court et grandissent dans l'apoplaste des cellules spécialisées du tissu de transmission enrichi en nutriment extracellulaire (Kandasamy *et al.,* 1994 ; Lennon *et al.,* 1998). A ce moment, le tube pollinique héberge trois noyaux distincts qui sont le noyau végétatif et les deux gamètes mâles fonctionnels. Le noyau végétatif contrôle la croissance du tube. La taille des tubes polliniques est très variable selon les espèces mais peut atteindre *in-vivo* une cinquantaine de centimètres chez les plantes à style long comme le maïs. Le tube pollinique est une cellule à croissance polarisée dont l'élongation se fait dans la zone apicale. Ainsi, afin de conserver un volume cellulaire relativement stable, la cellule végétative synthétise périodiquement, grâce aux callose

synthases (Cai *et al.,* 2011), des bouchons de callose permettant son maintien dans la zone apicale du tube.

Lorsque le tube a atteint l'ovule, il éclate et libère les deux cellules spermatiques aboutissant à la double fécondation (Figure 4). Dès lors, l'œuf principal, qui résulte de la fusion entre un noyau spermatique et l'oosphère (fécondation vraie), prolifère en un embryon. La fusion du second noyau spermatique avec les deux noyaux polaires de l'ovule (pseudo-fécondation), donne naissance à l'albumen, destiné à servir de réserves nutritives à l'embryon. Cet albumen subsistera au cours de la maturation de la graine (graine albuminée) ou sera digéré par l'embryon afin de stocker les réserves dans les cotylédons (graine exalbuminée).

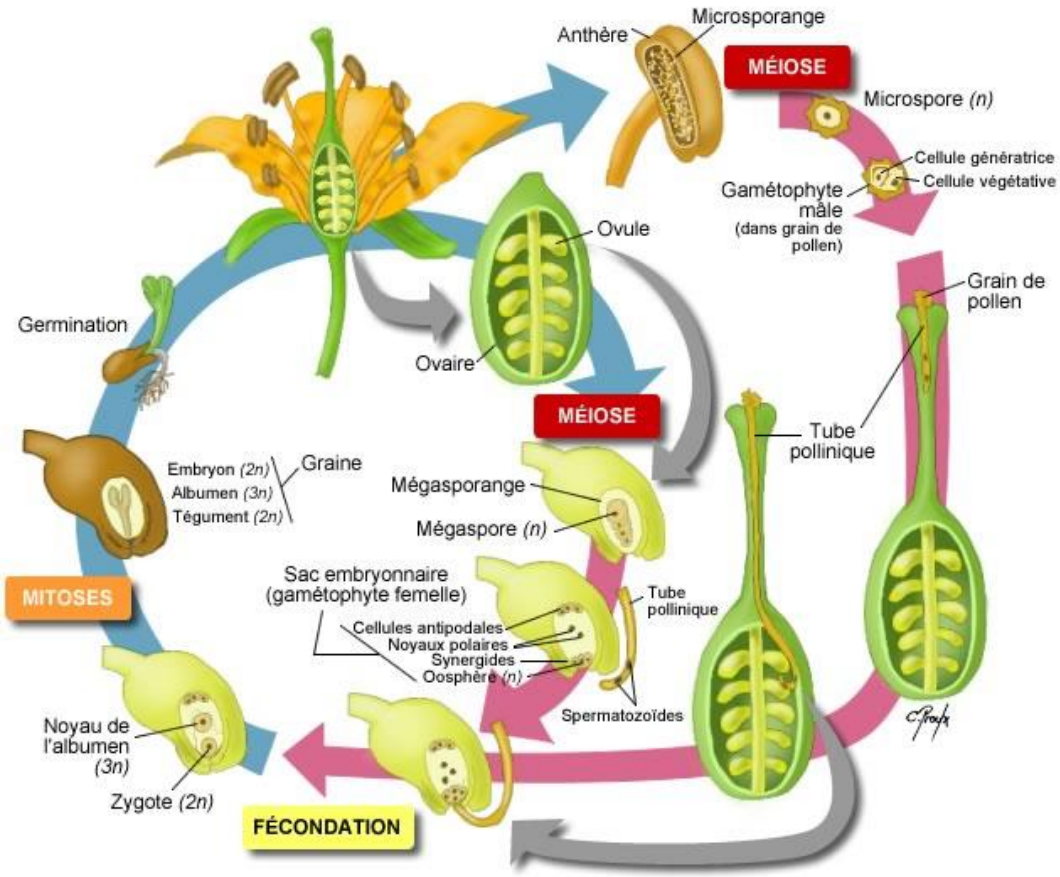


Figure 4 : Cycle de reproduction sexuée des angiospermes (http://www.colvir.net/prof/chantal.proulx/images/reproduction/<cycle-Angio.jpg).

I. 2. c. Formation des gamétophytes :

2. c. 1. Formation des ovules :

La gamétogenèse femelle est une succession d'étapes ayant lieu dans la partie ovarienne de la plante. Le mégasporocyte, cellule initiale, subit une division méïotique aboutissant à la formation de 4 cellules haploïdes (Figure 4). Sur l'ensemble de ces cellules, trois vont dégénérer tandis que la quatrième cellule (le mégaspore) va subir trois mitoses successives et produire le gamétophyte femelle encore appelé le sac embryonnaire. Celui-ci, destiné à devenir le siège de la future fécondation, se trouve au centre du nucelle recouvert superficiellement par les téguments.

Le sac embryonnaire est composé de 8 noyaux répartis dans 7 cellules de taille inégale et de rôle distinct : une vaste cellule centrale pourvue de deux noyaux (noyaux polaires), trois cellules situées au voisinage de l'orifice de l'ovule, le micropyle (une cellule médiane (oosphère) entourée par deux cellules appelées synergides) et trois cellules autour du pôle opposé au micropyle (cellules antipodales) (Figure 4) (Bewley *et al.,* 2000 ; Yadegari et Drews, 2004 ; Boavida *et al.,* 2005).

2. c. 2. Formation du pollen :

La gamétogenèse mâle se déroule dans les anthères (Figure 5). Les grains de pollen, ou gamétophytes mâles, sont issus d'une méïose du sporocyte et seront libérés des anthères après leurs maturations (Twell *et al.,* 1998 ; Honys et Twell, 2004). La cellule mère initiale (microsporocyte) subit une méïose qui donne 4 cellules filles haploïdes (microspore) en tétrade.

Durant la prophase I, un dépôt massif de callose (β-1,3-glucane) apparait entre les différents microsporocytes (Figure 5 D). Les microspores sont séparés les uns des autres par la formation d'une paroi de callose. Par la suite, les microspores sont libérés de la tétrade par l'action conjointe d'enzymes comme des glucanases, des polygalacturonases (PGases) et des pectines méthylestérases (PMEs) issues du tapis staminal, couche cellulaire bordant les locules de l'anthère (Figure 5 E, F) (Hird *et al.,* 1993 ; Rhee *et al.,* 2003 ; Francis *et al.,* 2006). Cette séparation permet ainsi l'expansion et la maturation de chaque microspore.

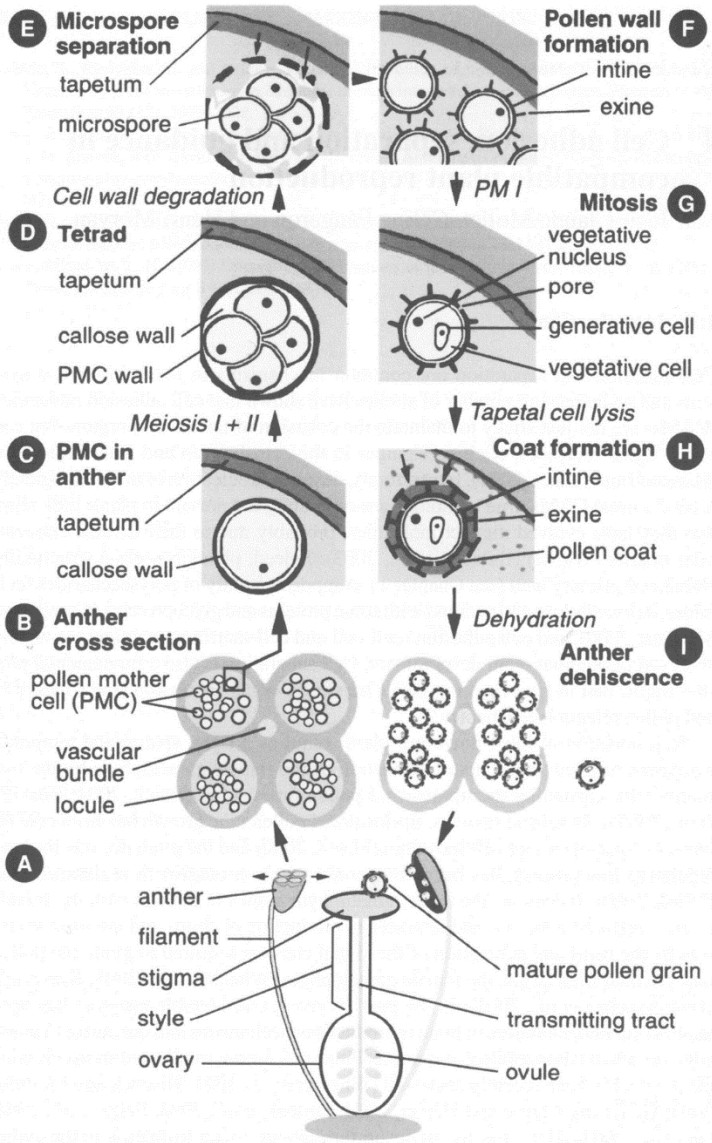


Figure 5 : Principales étapes aboutissant à la formation du pollen mature chez *A. thaliana* (D'après Mollet *et al.,* 2007).

Après la méïose II, la formation de la paroi du pollen commence notamment avec le dépôt de fibrilles de cellulose (primexine) qui est renforcée par des protéines et des lipides. Le dépôt final de sporopollenine (composant principal de l'exine) donnera la taille et la forme du grain de pollen (Piffanelli *et al.,* 1998) (Figure 5 G, H et Figure 6).

Un nombre important de facteurs de transcription participant à la formation de l'exine a été récemment décrit. *AtMYB103/MALE STERILE 188* (*MS188*) est un facteur de transcription qui est spécifiquement exprimé dans les anthères et les trichomes d'*A. thaliana* (Li *et al.,* 1999 ; Higginson *et al.,* 2003). Zhang *et al.,* (2007) ont décrit que *AtMYB103/MS188* régulait directement l'expression d'un gène précédemment décrit comme impliqué dans la formation de l'exine (*MS2*) ainsi que le gène *callase-related A6*.

L'étude du mutant Knock-Out (KO) pour le gène *AtMYB103/MS188* a montré une dégénérescence précoce du tapis staminal ainsi que des microspores anormaux (Zhang *et al.,* 2007). Le gène *MALE STERILE 1* (*MS1*)/*HACKLY MICROSPORE* (*HKM*), codant pour une protéine leucine zipper-like, est également impliqué dans la fonction du tapis staminal (Ariizumi *et al.,* 2005 ; Vizcay-Barrena et Wilson, 2006 ; Ito *et al.,* 2007 ; Yang *et al.,* 2007). Les analyses phénotypiques du mutant *ms1* indiquent que *MS1* est impliqué dans la formation de la primexine, la synthèse de la sporopollenine ainsi que dans le développement du tapis staminal (Ito *et al.,* 2007). L'étude du gène codant EFD (EXINE FORMATION DEFECT) a montré qu'il était aussi nécessaire pour la formation de la primexine et que l'absence d'expression de celui-ci induisait un défaut de fertilité du pollen chez *A. thaliana* (Hu *et al.,* 2014). D'autres résultats ont aussi démontré que le gène *MS1* est exprimé dans les cellules du tapis staminal (Yang *et al.,* 2007). D'ailleurs, c'est à partir du tapis qu'une partie de l'exine se développe (Quilichini *et al.,* 2014). Un autre facteur de transcription impliqué dans la formation de l'exine, a été identifié par Gibalová *et al.,* (2009) qui ont démontré que les mutants *Atbzip34* présentaient des défauts dans la structure de l'exine.

A la fin de la maturation du grain de pollen, l'exine est complète. Elle est composée de deux couches : la sexine (à l'extérieur) et la nexine (à l'intérieur) (Figure 6) (Paxson-Sowders *et al.,* 1997). La sexine est majoritairement composée de sporopollenine (Lou *et al.,* 2013). En plus de l'exine, le grain de pollen possède une paroi interne, l'intine, partiellement exposée à l'environnement *via* les apertures (Figure 6) et composée principalement de polysaccharides comme la callose, la cellulose et les pectines (Hesse *et al.,* 2009).

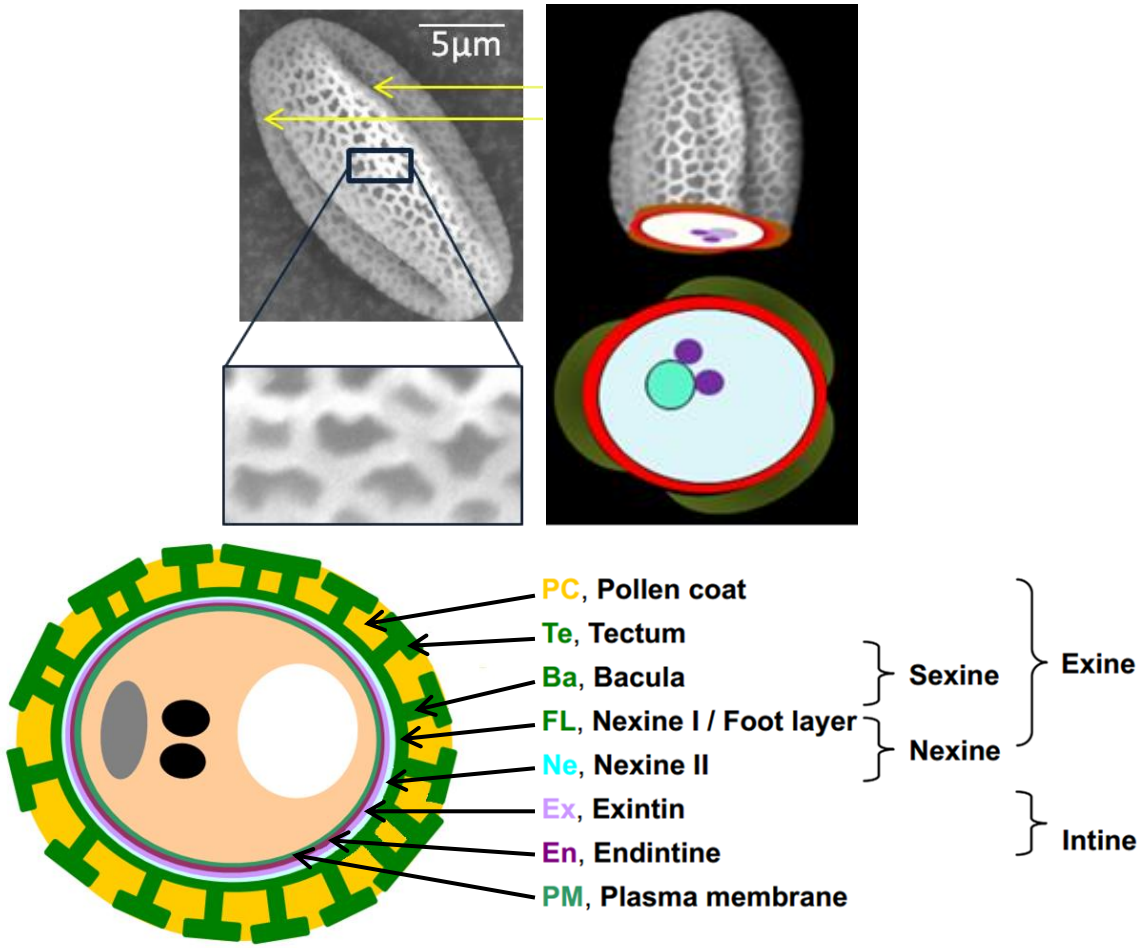


Figure 6: Microscopie électronique à balayage et schémas d'un grain de pollen sauvage chez *A. thaliana*.
Les apertures sont indiquées par les flèches jaunes sur un grain de pollen sec possédant une forme oblongue. L'encadré zoomé montre les différentes enveloppes du grain de pollen, l'exine à l'extérieur (blanc MEB et vert schéma) et l'intine à l'intérieur (rouge schéma). En bas, le schéma de la structure de la paroi du pollen montre que l'exine est divisée en deux couches : la sexine et la nexine. La sexine se compose du tectum et de la bacula tandis que la nexine est composée de la *footlayer* (nexine I) et de l'endexine (nexine II). Le manteau pollinique (pollen coat, PC) provenant du tapis staminal est déposé sur l'exine. L'intine est composée de deux couches, l'exintine et l'endintine (d'après Jiang *et al.,* 2013).

La dernière étape de maturation du grain de pollen est la déshydratation. Cette étape est accompagnée de la mise en place du manteau pollinique, puis, d'un ralentissement progressif du métabolisme.

En parallèle au cours de la maturation du pollen, le noyau subit une division mitotique asymétrique, donnant la cellule végétative et la cellule génératrice (Figure 5 G). Cette dernière subit une seconde mitose qui aboutira à la formation des deux cellules spermatiques (Twell, 2011). Cette mitose aura lieu avant l'anthèse chez les espèces tri-nucléées (*A. thaliana* ou le maïs) ou après la germination du grain de pollen chez les

espèces bi-nucléées (le lys, le tabac ou la tomate) (Twell *et al.,* 1998; Edlund *et al.,* 2004; McCormick, 2004; Twell, 2006; Takeda et Paszkowski, 2006).

I. 2. d. La pollinisation et la croissance du tube pollinique :

Une fois libérés des anthères, les grains de pollen peuvent être transportés par le vent (plantes anémophiles), les insectes (plantes entomophiles) ou animaux comme les oiseaux (plantes ornithophiles), les chauves-souris (plantes chiroptérophiles) ou par l'eau (hydrogamie, réservée à quelques rares espèces de plantes aquatiques qui dispersent leur pollen de forme très allongée dans l'eau, ce qui permet aux courants de le transporter d'une plante à l'autre). Certaines espèces se reproduisent préférentiellement par autogamie et d'autres non car elles possèdent des barrières anatomiques, temporelles ou génétiques qui vont empêcher l'autofécondation.

2. d. 1. Les systèmes d'incompatibilité génétique :

Il existe l'incompatibilité inter-spécifique qui permet à une plante de rejeter le pollen d'une plante d'une autre espèce et l'incompatibilité intra-spécifique qui induit le rejet du pollen issu de la même plante favorisant ainsi un plus grand brassage génétique. Récemment, il a été proposé un modèle dans lequel une voie universelle de l'inhibition du pollen est partagée par les deux systèmes d'incompatibilités (Kitashiba et Nasrallah, 2014). Une étude a démontré que la ligase E3 ARC1 est nécessaire pour l'auto-incompatibilité chez deux espèces différentes de Brassicacées, *Brassica napus* et *Arabidopsis lyrata (A. lyrata)*, et est fréquemment supprimée des espèces auto-compatibles, y compris chez *A. thaliana* (Stone *et al.,* 2003). Dans une autre étude, plus récente, *ARC1* a été examinée pour reconstituer l'auto-incompatibilité chez *A. thaliana* et il a été découvert un rôle important des *ARC1* dans la réponse forte et stable du rejet du pollen lorsqu'elles sont exprimées avec deux autres facteurs d'auto-incompatibilité d'*A. lyrata* (Indriolo *et al.,* 2014). De plus, *ARC1* produirait un phénotype d'herkogamie dans les fleurs *A. thaliana*. Ainsi, l'expression de *ARC1* entraînerait, chez *A. lyrata*, le rejet de l'auto-pollen et jouerait un rôle clé dans l'évolution et le maintien des systèmes de pollinisation croisée (Indriolo *et al.,* 2014).

L'auto-incompatibilité pollinique paraît être une des méthodes du contrôle de la pollinisation les plus élaborées chez les végétaux, car elle fait appel à un complexe

multigénique dit complexe SI (pour *Self Incompatibility* ou rejet du Soi). Le rejet du Soi (de l'auto-pollen) se produit lorsque l'haplo-type S du pollen correspond à un des haplo-types du pistil. Ces allèles sont localisés, dans les deux cas que nous allons présenter, sur un seul locus (De Nettancourt, 2001 ; Takayama et Isogai, 2005 ; Poulter *et al.,* 2008 ; Zhang *et al.,* 2009 ; Kitashiba et Nasrallah, 2014). La présence d'un allèle commun (indiqué par un chiffre) entre le grain de pollen et le pistil déclenche une réaction de rejet. La croissance du tube se trouve compromise soit très tôt (à la surface du stigmate, Figure 7 D) soit plus tardivement au cours de la progression du tube pollinique (Figure 7 C) dans le tissu de transmission (Takasaki *et al.,* 2000 ; Takayama *et al.,* 2000 ; Samuel *et al.,* 2009 ; Tsuchimatsu *et al.,* 2010 ; Osaka *et al.,* 2013).

Les deux mécanismes de rejet les plus étudiés sont les rejets sporophytique et gamétophytique (Figure 7) :

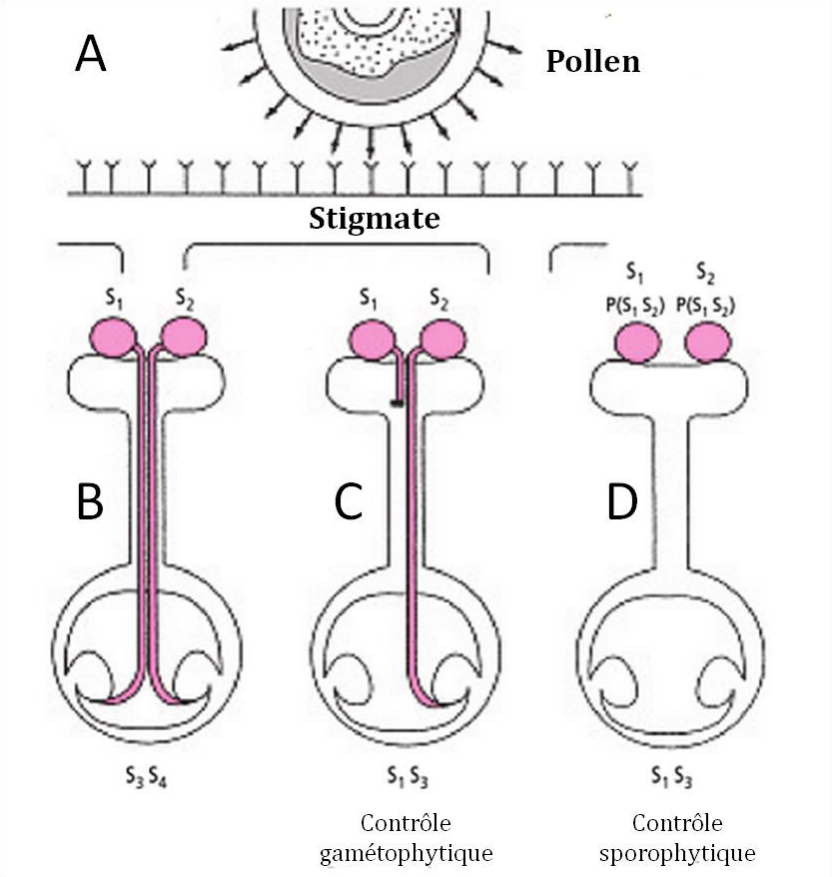


Figure 7 : Représentation schématique de l'auto-incompatibilité génétique du pollen (D'après Tourte *et al.,* 2005).

L'incompatibilité sporophytique

Chez les Brassicacées et plus précisément chez le chou, espèce la plus étudiée, le système d'incompatibilité est sous la dépendance du génome paternel diploïde (contrôle sporophytique) (Figure 7 D).

Le système repose sur la reconnaissance au niveau des papilles stigmatiques d'un déterminant mâle et d'un déterminant femelle. Le déterminant mâle, SCR/SP11 (*S-locus Cysteine-Rich / S-locus Protein 11*), est un peptide sécrété d'environ 80 acides aminés riche en résidus cystéines et présentant certaines similarités avec les défensines (Schopfer *et al.,* 1999 ; Takayama *et al.,* 2000). Il se trouve à la surface du grain de pollen dans le manteau pollinique et provient du tissu diploïde, le tapis staminal (Schopfer *et al.,* 1999 ; Takayama *et al.,* 2000).

Le déterminant femelle forme un complexe protéique multimérique à la surface des papilles stigmatiques constitué d'un récepteur transmembranaire à activité kinase (SRK, *S-locus Receptor Kinase*) et d'une glycoprotéine (SLG, *S-locus Glycoprotein*) (Nasrallah et Nasrallah, 1993 ; Takasaki *et al.,* 2000). Il a été montré par immunolocalisation que le récepteur SRK est majoritairement présent dans des endosomes et qu'une petite fraction est détectée au niveau de la membrane plasmique (Ivanov et Gaude, 2009). Cette faible proportion de SRK au niveau de la membrane semble cependant suffisante pour fixer le ligand. Le récepteur SRK est alors rapidement internalisé après perception du signal (Ivanov et Gaude, 2009). La reconnaissance entre la partie extracellulaire du complexe et du déterminant mâle provoque l'autophosphorylation du récepteur et induit une cascade de réaction intracellulaire qui aboutit au rejet du pollen. Comme la réaction d'incompatibilité se traduit par une absence de réhydratation des grains de pollen, une des cibles proposées pourrait être une dégradation localisée d'une aquaporine-like : MOD-locus associated aquaporin, mais aucune preuve expérimentale ne l'a montrée (Goring, 2000 ; Kachroo *et al.,* 2002).

A. thaliana, autre Brassicacée, ne possède pas un système fonctionnel de rejet du soi. L'autofécondation est favorisée bien que les gènes d'incompatibilités aient été mis en évidence (Sherman-Broyles *et al.,* 2007). D'ailleurs, une étude récente portant sur le rejet du soi de plantes transgéniques d'*A. thaliana*, a mis en évidence l'importance de la N-glycosylation du recepteur SRK pour la mise en place du rejet, permettant notamment une meilleure internalisation de celui-ci (Yamamoto *et al.,* 2014). Il a

récemment été montré que la perte de ce mécanisme de rejet, au cours de l'évolution, était due à une mutation dans les gènes codant pour le déterminant mâle (Tsuchimatsu *et al.,* 2010).

L'incompatibilité gamétophytique

Chez les espèces comme les Solanacées, les Plantaginacées et les Rosacées, le SI est contrôlé génétiquement par le gamétophyte mâle. Ce système de rejet est le plus répandu et 50% des plantes le posséderaient (Steinbachs et Holsinger, 2002).

Chez le tabac et le pétunia, le gène S du pistil code pour une ribonucléase de la famille T2, nommée S-RNase (Figure 8 A et B). Ces S-RNases secrétées par le tissu de transmission pénètrent dans les tubes polliniques et dégradent les ARNr empêchant toute synthèse protéique aboutissant à l'arrêt de la croissance du tube (McClure *et al.,* 1989 ; Clark *et al.,* 1990 ; Lee *et al.,* 1994 ; Murfett *et al.,* 1994 ; Sassa *et al.,* 1996 ; Xue *et al.,* 1996). Les S-RNases pénètrent à la fois dans les tubes polliniques incompatibles mais aussi compatibles suggérant que ces dernières sont 1) inactives en pénétrant dans le tube pollinique puis activées dans les tubes incompatibles ou 2) rendues inactives ou isolées dans des organites chez les tubes polliniques compatibles (Luu *et al.,* 2000 ; Liu *et al.,* 2014).

Dans le pollen, le gène S coderait chez le pétunia pour de multiples protéines F-box paralogues, appelées SLF (*S-locus F-box*) (Lai *et al.,* 2002 ; Zhou *et al.,* 2003 ; Sijacic *et al.,* 2004 ; Qiao *et al.,* 2004 ; Kubo *et al.,* 2010 ; Williams *et al.,* 2014). Ces SLFs feraient partie d'un complexe SCF (*SKP1/Cullin1/F-box*), agissant comme des complexes ubiquitines ligases (Figure 8 A, B) qui seraient capables d'interagir avec les S-RNases du pistil, induiraient leurs poly-ubiquitinations et leurs dégradations par le protéasome 26S (Smalle et Vierstra, 2004 ; Liu *et al.,* 2014).

De plus, chez le tabac, d'autres facteurs non codés par les gènes S ont été mis en évidence dans la partie femelle et seraient aussi impliqués à différents stades de la réaction SI (Figure 8 B) : la 120K (une glycoprotéine de 120 kDa), la protéine HT-B et la *Na*StEP (*Nicotiana alata Stigmata Expressed Protein*) (McClure *et al.,* 1999 ; Hancock *et al.,* 2005 ;. Jimenez-Durán *et al.,* 2013).

La 120K, une glycoprotéine spécifique du style, et la protéine HT-B sont incorporées dans les tubes polliniques pendant la pollinisation (Lind *et al.,* 1996 ;

Schultz *et al.,* 1997). La suppression de l'expression de 120K empêche le rejet spécifique du pollen (Hancock *et al.,* 2005). De même, des études de perte de fonction ont montré que HT-B est aussi essentielle pour le rejet du pollen (McClure *et al.,* 1999 ; Kondo et al., 2002 ; O'Brien *et al.,* 2002 ; Sassa et Hirano, 2006 ; Puerta *et al.,* 2009). Finalement, *Na*StEP est un type d'inhibiteurs de protéases et un régulateur positif de la stabilité HT-B dans des tubes polliniques de *N. Alata* (Busot *et al.,* 2008 ; Jimenez-Durán *et al.,* 2013.).

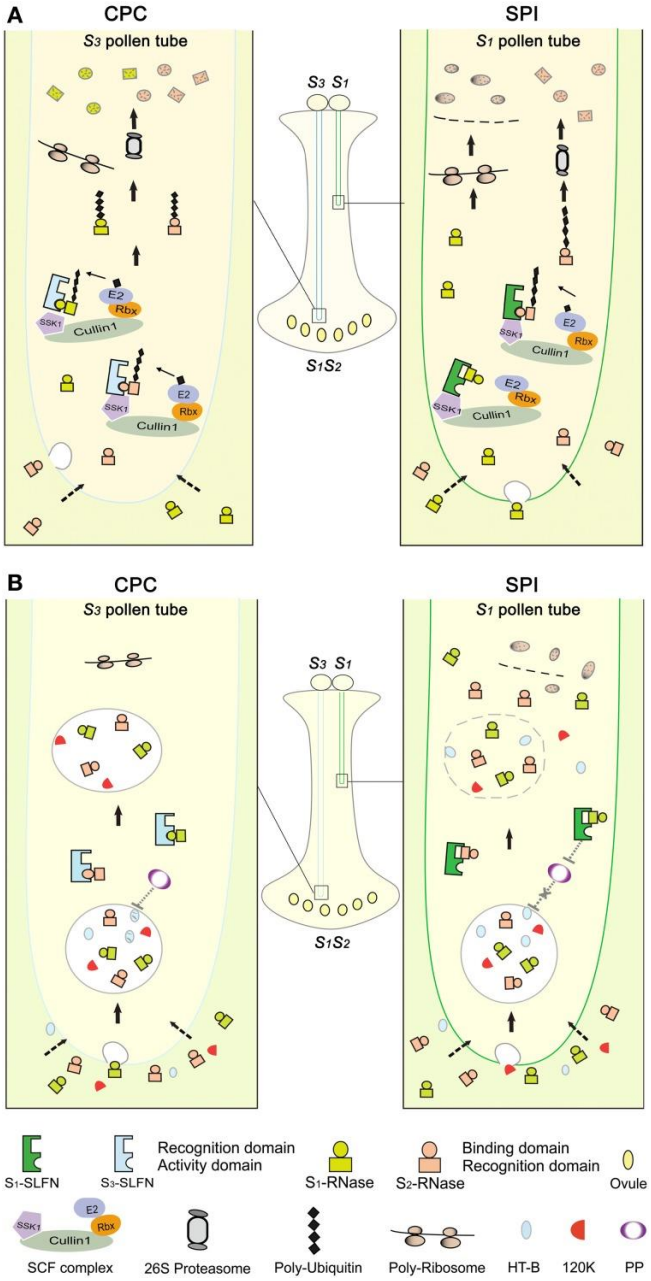


Figure 8 : Modèles du rejet gamétophytique induit par les S-RNases.
A. Modèle chez le pétunia, B. Modèle chez le tabac (D'après Liu *et al.,* 2014). CPC : Cross-pollen compatibility response ; SPI : Self pollen incompatibility response ; PP : Pollen protein .

2. d. 2. L'implication de l'eau dans la germination du pollen :

Plusieurs procédés durant la reproduction sexuelle chez les végétaux supérieurs nécessitent le mouvement de l'eau entre les cellules ou les tissus, comme cela se produit au cours de la déhiscence de l'anthère et de l'hydratation des grains de pollen après son dépôt sur un stigmate.

La paroi du grain de pollen est caractérisée par l'absence d'exine au niveau des apertures compensée par une double paroi d'intine permettant au grain de pollen une réhydratation rapide, en partie due à une différence de potentiel osmotique entre le grain de pollen et le stigmate (Taylor et Hepler, 1997). Cette réhydratation aboutit à la reprise de l'activité métabolique du grain de pollen, et donc à la croissance du tube pollinique (Lord et Russell, 2002).

Les aquaporines jouent un rôle central au cours de la réhydratation. Les aquaporines végétales peuvent être divisées en quatre sous-familles : *plasma membrane-intrinsic proteins* (*PIP*s), *tonoplast-intrinsic proteins* (*TIP*s), *nodulin26-like-intrinsic proteins* (*NIP*s) et *small and basic membrane-intrinsic proteins* (*SIP*s) (Soto *et al.,* 2008 ; Wudick *et al.,* 2009). Chez *A. thaliana*, six (sur 35) aquaporines sont exprimées dans le pollen : 2 NIPs (*At*NIP7-1, *At*NIP4) et 2 TIPs (*At*TIP1-3 et dans une moindre mesure *At*TIP5-1 (Pina *et al.,* 2005 ; Borges *et al.,* 2008 ; Qin *et al.,* 2009 ; Loraine *et al.,* 2013). Deux SIPs (*At*SIP1-1 et *At*SIP2-1) ne sont pas spécifiques du pollen mais sont également exprimées dans d'autres tissus (Ishikawa *et al.,* 2005 ; Pina *et al.,* 2005; Li *et al.,* 2011). Selon les études, des PIPs pourraient également être présentes dans les parties femelles (Marin-Olivier *et al.,* 2000 ; Dixit *et al.,* 2001).

Parce que ces aquaporines sont principalement localisées dans le tonoplaste, l'apparition des TIPs spécifiques du pollen a souligné le rôle de ces protéines dans le transport de l'eau vacuolaire. Ces aquaporines peuvent aussi faciliter le transport bidirectionnel des petits solutés ou de gaz à travers les membranes cellulaires (Soto *et al.,* 2008) permettant aussi à celles-ci de jouer un rôle dans la tolérance à la toxicité de certains éléments (Pang *et al.,* 2010 ; Wudick *et al.,* 2014).

Pour étudier le rôle physiologique putatif des aquaporines dans l'absorption d'eau et la croissance du tube pollinique, quatre gènes *PIPs* bien caractérisés chez *A. thaliana* ont été transitoirement exprimés dans le pollen du lys (Sommer *et al.,* 2008).

Ces quatre gènes *PIPs* ont été choisis parce qu'ils sont fortement exprimés dans les plantes d'*A. thaliana* (Kammerloher *et al.,* 1994 ; Jang *et al.,* 2004). L'expression a montré que les membres de la sous-famille PIP1 n'améliorent pas l'activité des canaux, tandis que les membres de la sous-famille PIP2 l'améliorent (Bots *et al.,* 2005a). Ceci suggère que ces aquaporines peuvent jouer un rôle dans le transport de l'eau dans le pollen. De plus, les aquaporines de la classe PIP2 seraient nécessaires pour la déshydratation efficace des anthères avant la déhiscence chez le tabac (Bots *et al.,* 2005b).

2. d. 3. L'implication des ions :

Une autre caractéristique remarquable de tubes polliniques en croissance est la distance qu'ils parcourent en une courte durée allant de quelques centaines de micromètres chez *A. thaliana* et jusqu'à 50 cm chez le maïs (Michard *et al.,* 2009 ; Mouline *et al.,* 2002). L'expansion du tube pollinique, nommée scalariforme, se fait exclusivement à l'extrême apex (Zonia et Munnik, 2008) qui présente une zone "claire" (*clear zone* ; Campanoni et Blatt, 2007) comme chez le lys (Figure 9) (Cai *et al.,* 2015 ; Hepler et Winship, 2015). Cette zone claire est composée de nombreuses vésicules de sécrétion golgienne qui migrent vers l'apex et s'accumulent sous forme d'anneau dans la région sub-apicale du tube où elles fusionnent avec la membrane plasmique pour soutenir la croissance du tube pollinique (Cheung et Wu, 2008 ; Bove *et al.,* 2008 ; Moscatelli et Idilli, 2009 ; Wang *et al.,* 2010 ; Zonia, 2010 ; Cai *et al.,* 2015 ; Hepler et Winship, 2015). La poussée du cytoplasme entraîne une élongation. En parallèle, un influx de calcium précède la poussée de croissance du tube pollinique (Hepler, 2005 ; Hepler *et al.,* 2012).

Cette croissance exclusivement apicale nécessite des changements coordonnés dans les propriétés de la paroi cellulaire, dans l'endo et l'exocytose, dans la régulation du cytosquelette et des variations des flux ioniques suivies éventuellement par la modification de la pression de turgescence. Des modèles qui tiennent compte de la prévalence soit de l'une soit de l'autre force ont été proposés : un «modèle de la paroi cellulaire» ou un «modèle hydrodynamique», comme forces motrices de la croissance du tube pollinique (Zonia et Munnik, 2011 ; Winship *et al.,* 2011 ; Cai *et al.,* 2015 ; Hepler et Winship, 2015).

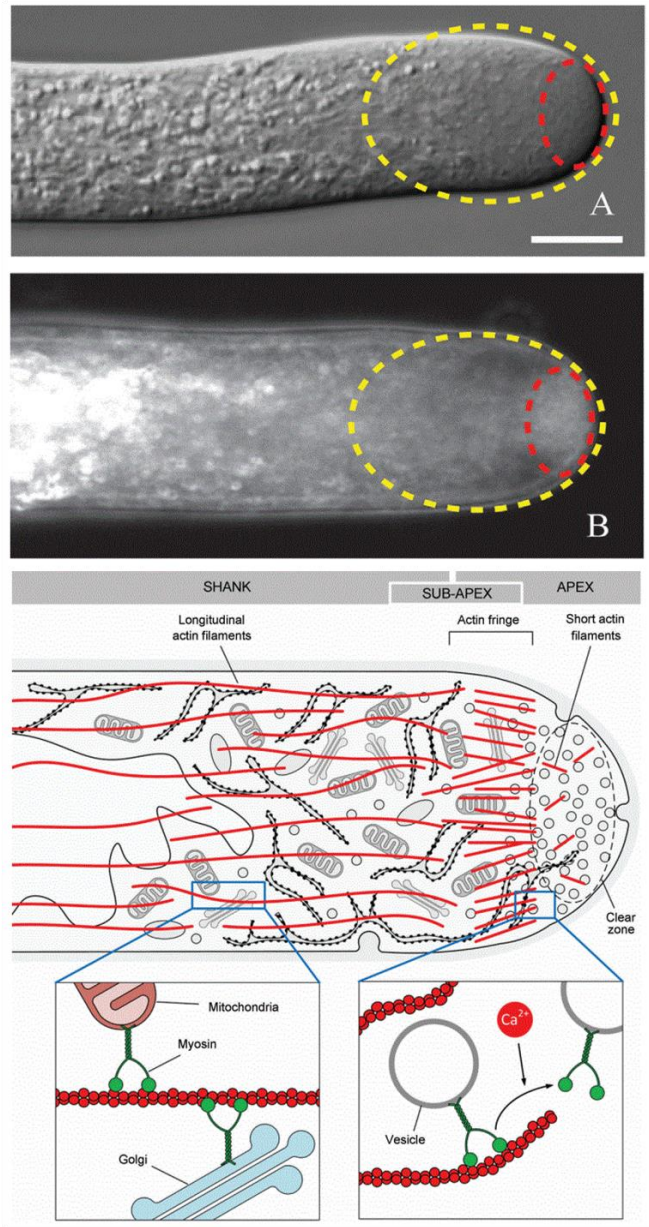


Figure 9 : Représentations de la zone claire (cercles jaunes ; A et B) et de l'apex (cercles rouges ; A et B) du tube pollinique chez le lys suivies d'un schéma de l'apex d'un tube pollinique avec représentation de la zone claire.
La pointe est caractérisée par une concentration de calcium cytoplasmique élevé, et est remplie par des vésicules sécrétoires denses, qui fusionnent à la membrane. Les organites y compris les mitochondries, RE et appareil de Golgi (du système endomembranaire) sont exclus de l'apex. Les microtubules et les filaments d'actine cytoplasmiques sont parallèles à la direction de croissance. Des microfilaments plus courts guident la livraison des vésicules à la zone claire (clear zone ; d'après Cai et al., 2015 et Hepler et Winship, 2015).

2. d. 4. Les différents signaux de guidage :

Chez *A. thaliana*, le tube pollinique va s'enrouler autour des papilles du stigmate avant de s'introduire dans la paroi entre les cellules des tissus femelles (Edlund *et al.,* 2004). Les tubes vont croître, en traversant le style, adhérant aux cellules du tissu de

transmission et fournissant des nutriments (Lennon *et al.,* 1998 ; Lord et Russell, 2002, Palanivelu et Preuss, 2000).

Le tube pollinique émerge ensuite vers le septum sur lequel il croît en contact étroit puis sur le funicule pour se diriger vers le micropyle (Lennon *et al.,* 1998) où des mécanismes d'attraction ont été mis en évidence. Parmi ces signaux, un gradient d'acide gamma-aminobutyrique (GABA) régulé par *POP2* (*pollen-pistil-interaction2*), une transaminase qui dégrade le GABA, permettrait le guidage des tubes polliniques vers les ovules (Palanivelu *et al.,* 2003). Ce GABA est donc impliqué dans la croissance du tube pollinique, mais les mécanismes moléculaires et cellulaires qu'il module restent largement inconnus, malgré de nombreuses études (Palanivelu *et al.,* 2003 ; Yu *et al.,* 2006). Il a notamment été démontré que les signaux GABA pouvaient déclencher l'activation de différentes voies qui convergent vers la régulation de la F-actine et directement ou indirectement dans le contrôle du trafic des vésicules et donc la régulation de la croissance dans l'apex du tube pollinique (Dowd *et al.,* 2006). Finalement, un ajout exogène de GABA actionnerait des canaux calciques putatifs sur les membranes plasmiques des grains de pollen et tubes polliniques chez le tabac (Yu *et al.,* 2014).

Un autre acide aminé rare, la D-sérine (D-Ser), a aussi été impliqué dans la croissance des tubes polliniques (Michard *et al.,* 2011). Cet acide aminé serait généré par le pistil à partir de la L-sérine. D-ser serait capable d'activer des GLRs (Glutamate Receptor-like) dans la zone apicale des tubes polliniques permettant un influx de Ca^{2+} dans le cytoplasme affectant l'intensité et les amplitudes d'oscillations calciques dans le tube. En effet, la plante mutante dont le pistil est déficient en activité serine racemase (SER1, enzyme capable de convertir la L-ser en D-ser) empêche la progression normale des tubes polliniques (Michard *et al.,* 2011).

Chez *Torenia fournieri*, il a été montré que les tubes polliniques étaient attirés vers les ovules grâce aux polypeptides LUREs (attraction en anglais) riches en cystéines présentant comme SCR/SP11 des similarités avec les défensines et sont sécrétés par les synergides (Higashiyama *et al.,* 2001 ; Okuda *et al.,* 2009). Il est intéressant de noter que les tubes polliniques cultivés *in-vitro* ne sont pas sensibles à ces peptides alors que ceux cultivés en semi-*in-vitro*, c'est-à-dire étant préalablement passés à travers le stigmate et le style sont capables de les percevoir (Higashiyama *et al.,* 1998). Ces résultats suggèrent que les tubes polliniques sont rendus compétents à percevoir ces signaux lors de leurs

croissances dans les différents tissus femelles (Okuda et Higashiyama, 2010 ; Okuda *et al.,* 2013). Chez le maïs, une attraction micropylaire des tubes polliniques serait aussi provoquée par un peptide *Zm*EA1 (*Zea mays* EGG APPARATUS1) (Márton *et al.,* 2005).

Lors de l'arrivée du gamétophyte mâle au sac embryonnaire, le tube pollinique va pénétrer dans une des deux synergides et libérer ses deux cellules spermatiques. L'explosion du tube pollinique serait contrôlée par *FERONIA* (*FER*), un récepteur transmembranaire à activité kinase localisé dans l'appareil filiforme des synergides (Escobar-Restrepo *et al.,* 2007). *FER* contrôlerait directement ou indirectement *NORTIA* (*NTA*), un autre récepteur (Kessler *et al.,* 2010). En effet, chez les mutants *fer* et *nta*, les tubes polliniques n'explosent pas et continuent à se développer dans le sac embryonnaire (Escobar-Restrepo *et al.,* 2007 ; Kessler *et al.,* 2010). Une étude récente (Duan *et al.,* 2014) a montré que *FER* contrôle la production élevée des espèces réactives de l'oxygène (ROS) à l'entrée du gamétophyte femelle pour permettre d'induire la rupture du tube pollinique et la libération des cellules spermatiques. Les tests de croissance de tubes polliniques *in-vitro* et dans le pistil ont démontré que les radicaux libres hydroxyles, probablement les molécules d'oxygène les plus réactives, induisent la rupture du tube pollinique dans un processus dépendant de l'activation des canaux calciques et d'une Rho GTPase (Duan *et al.,* 2014).

Des homologues de *FER* ont aussi été trouvés dans le tube pollinique (*ANXUR1* et *ANXUR2*). L'analyse des tubes polliniques *anxur1/anxur2* a révélé que leur croissance *in-vitro* est perturbée (éclatement des tubes dans la zone apicale) et qu'*in-vivo* ils sont incapables de fertiliser les ovules (Boisson-Dernier *et al.,* 2009), suggérant qu'*ANXUR1* et *ANXUR2* joueraient un rôle important dans le maintien de l'intégrité de la paroi du tube dans l'apex. Récemment, il a été montré qu'ANXUR1 et ANXUR2 moduleraient les pulses de calcium dans la zone apicale du tube par activation des canaux calciques et des ROS *via* l'activité NADPH oxydase (Boisson-Dernier *et al.,* 2013).

De plus, une étude récente portant sur deux nouveaux membres de la voie de signalisation médiée par FER, a révélé que ces deux protéines TURAN (TUN) et EVAN (EVN) sont impliquées dans la N-glycosylation des protéines dans le RE (Lindner *et al.,* 2015). TUN est une protéine appartenant à la famille des UDP-glycosyltransférases, et elle serait nécessaire pour la croissance du tube pollinique, notamment en affectant la stabilité d'ANX1 et d'ANX2, les homologues de FER spécifiques du pollen. EVN serait essentielle pour le développement du pollen. Les phénotypes observés chez ces mutants

sont les mêmes que pour les mutants *fer*, à savoir une prolifération de la croisssance du tube pollinique à l'intérieur du gamétophyte femelle sans rupture du tube pollinique, ne permettant pas la fécondation (Lindner *et al.,* 2015).

I. 2. e. La culture *in-vitro* des tubes polliniques :

L'étude des tubes polliniques est possible *in-vitro*, notamment grâce à la mise en place de milieux de germination artificiels simples contenant au minimum du saccharose, du bore et du calcium (Boavida et McCormick, 2007). Cette fonctionnalité a permis d'utiliser les tubes polliniques comme d'excellents modèles pour les études de trafic cellulaire, de flux ioniques, de biosynthèse, de mise en place et de remodelage des composés pariétaux (Cai et Cresti, 2009 ; Mollet *et al.,* 2013 ; Cai *et al.,* 2015 ; Hepler et Winship, 2015). Néanmoins, il est à noter que les longueurs de tubes obtenues in-vitro sont très en dessous de celles observées *in-vivo* en raison sans doute de nombreux composés produits par le pistil et utilisés par les tubes polliniques lors de leurs croissances (Lord, 2000).

La capacité des grains de pollen à germer et des tubes polliniques à pousser *in-vitro* est très dépendante des espèces. Les tubes polliniques de lys, de tabac, de pois ou de tomate sont cultivés très facilement et ont des croissances rapides (Mollet JC, communication personnelle). Pour *A. thaliana*, la culture *in-vitro* a été plus problématique. En effet, le premier milieu de germination de pollen développé par Fan *et al.* (2001) a permis l'obtention de tubes polliniques assez courts (environ 135 µm de longueur) avec un taux de germination n'excédant pas 75%. Les conditions de culture ont été optimisées six années plus tard par Boavida et McCormick (2007). Ce milieu permet d'obtenir des taux de germination proches de 80% et des longueurs de tubes supérieures à 1 mm après 12 h de culture. Récemment, l'ajout exogène de 0,25 mM de spermidine ou 10 mM de GABA et la culture sur membrane de cellulose ont permis d'obtenir des taux de germination de l'ordre de 90% bien que la longueur des tubes restât inférieure (entre 300 et 800 µm après 24 h de culture) (Rodriguez-Enriquez *et al.,* 2013) à celle obtenue dans le milieu de Boavida et McCormick (2007).

Le choix du milieu de culture est central lors de travaux sur la germination et la croissance du pollen. En effet, la composition du milieu de culture peut fortement influencer l'expression de gènes et plus particulièrement l'expression de gènes

impliqués dans la biosynthèse et le remodelage des composés pariétaux (Costa *et al.,* 2013). De même, l'utilisation d'un milieu sub-optimal peut aussi exacerber un phénotype lors d'études de mutants. De ce fait, le choix du milieu de culture lors d'études *in-vitro* doit être bien défini au départ. Notre choix s'est porté sur le milieu développé par Boavida et McCormick (2007) qui est actuellement largement utilisé par la communauté scientifique et en routine au laboratoire depuis plusieurs années (Dardelle *et al.,* 2010 ; Dumont *et al.,* 2014 ; Paynel *et al.,* 2014 ; Leroux *et al.,* 2015).

I. 3. LA PAROI VÉGÉTALE :

Les cellules végétales sont entourées d'une matrice extracellulaire appelée également paroi. Lors des mitoses, les cellules sont séparées par une lamelle moyenne riche en polysaccharides pectiques puis chaque cellule va synthétiser une paroi dite primaire qui constituera l'unique enveloppe durant toute la croissance cellulaire. Cette paroi confère à la cellule de multiples fonctions tant physiques (squelette de la plante) que biologiques (protection et signalisation). Ainsi, outre sa capacité à maintenir la turgescence cellulaire (Ray *et al.,* 1972) et la transduction de signaux (Shibuya et Minami, 2001 ; Roberts, 2001), notamment pour la défense des plantes (Silipo *et al.,* 2010), elle est également impliquée dans l'adhésion cellulaire (Durand *et al.,* 2009) ou encore dans la communication avec les cellules environnantes (Brownlee, 2002). Une fois la croissance cellulaire terminée, certains tissus synthétiseront une paroi dite secondaire pour consolider la paroi primaire, conférant ainsi aux tissus une plus forte rigidité.

La biosynthèse et la mise en place de la paroi présentent un coût énergétique élevé pour la plante. On estime à 10% les gènes impliqués dans le métabolisme de la paroi chez *A. thaliana*, regroupant la biosynthèse, le transport et le remodelage des molécules pariétales ainsi que la régulation de tous ces processus (McCann et Carpita, 2008). Malgré l'importance de la germination des grains de pollen et la croissance des tubes polliniques pour assurer la double fécondation, peu de données sont disponibles concernant la biosynthèse et le remodelage de la paroi du tube pollinique au cours de sa croissance. Ce chapitre sur la paroi végétale se focalisera sur la paroi primaire et plus particulièrement sur la paroi des grains de pollen et des tubes polliniques, modèles de cellules à croissance polarisée utilisés lors de cette étude.

I. 3. a. La paroi primaire :

La paroi primaire est principalement de nature polysaccharidique. Trois familles de polysaccharides sont distinguées dans la paroi primaire : la cellulose, les hémicelluloses et les pectines (Figure 10). Des protéines structurales et enzymes pouvant être glycosylées résident aussi dans cette matrice (Gibeaut et Carpita, 1994).

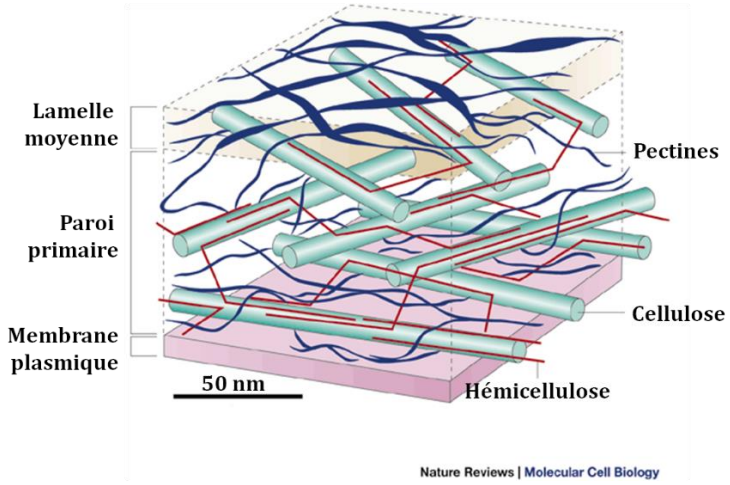


Figure 10 : Représentation schématique de la paroi d'une cellule végétale (D'après Smith, 2001).

La première caractérisation complète des polysaccharides pariétaux chez *A. thaliana* provient des travaux de Zablackis *et al.* (1995). Les auteurs estiment que la paroi isolée de feuilles contient environ 40 % de pectines, 24 % d'hémicelluloses, 14 % de cellulose et une même proportion de protéines.

La biosynthèse de chacun des polymères pariétaux mobilise un grand nombre de protéines enzymatiques appartenant à la famille des CAZYmes pour "Carbohydrate-Active enZYmes" (Cantarel *et al.,* 2009). L'ensemble de ces protéines est regroupé dans une base de données disponible sur le site http://www.cazy.org.

I. 3. b. Les protéines pariétales :

Il existe 2 familles principales de protéines pariétales, les glycoprotéines riches en hydroxyproline (Hydroxyproline-Rich GlycoProteins, HRGPs) et les protéines riches en proline (Proline-Rich Proteins, PRPs).

3. b. 1. Les glycoprotéines riches en hydroxyproline (HRGP) :

Cette superfamille de protéines est largement répandue dans le règne végétal depuis les algues jusqu'aux plantes supérieures (Adair et Appel, 1989). Elle représente entre 5 à 10 % de la masse sèche de la paroi des suspensions cellulaires (Wilson et Fry, 1986). Les glycoprotéines riches en hydroxyproline (HRGP) sont des protéines végétales de la paroi cellulaire liées à la croissance et au développement des plantes (Showalter *et al.,* 2010). La famille des HRGPs regroupe les arabinogalactane-protéines (AGPs), en

général fortement *O*-glycosylées et les extensines, le plus souvent modérément *O*-glycosylées (Showalter *et al.,* 2010). Néanmoins, il existe des protéines chimères, ainsi une HRGP de 120 kDa, spécifique du style de *Nicotiana alata* (*N. alata*) et précédemment décrite comme impliquée dans le rejet gamétophytique, possède un domaine extensine en N-terminal et un domaine de type AGP en C-terminal (C-term) (Schultz *et al.,* 1997).

Les extensines :

Les extensines représentent une classe de HRGP modérément à fortement *O*-glycosylée et largement distribuée dans le règne végétal (Kieliszewski et Lamport, 1994 ; Lamport *et al.,* 2011). Les extensines se caractérisent par une richesse en Hyp et en Ser, mais aussi en d'autres acides aminés comme Val, Tyr, Lys et His. Elles sont aussi caractérisées par la présence du motif Ser-(Hyp)n qui peut représenter jusqu'à 60 % de la chaîne polypeptidique (Showalter, 2001).

Les *O*-glycanes peuvent représenter jusqu'à 60 % de la masse moléculaire de la protéine. Cette *O*-glycosylation est représentée en majorité (90-97 %) par des courtes chaînes latérales de résidus arabinoses (de 1 à 4) liées aux résidus Hyp (Hyp-$(Ara)_{1-4}$), avec une forte proportion de tri et tétra-arabinoses (Akiyama *et al.,* 1980) et un à deux galactoses liés en alpha sur des résidus Ser (Lamport *et al.,* 1973).

Les extensines sont rapidement insolubilisées après leur sécrétion dans les parois. Il existe également des interactions ioniques et des liaisons covalentes entre les extensines et d'autres composés pariétaux. En effet, les extensines sont capables d'auto-assemblage pour former des complexes chargés positivement au pH extracellulaire (environ 4,5) du fait de l'abondance des résidus Lys. Elles sont aussi capables d'interagir avec les domaines pectiques chargés négativement (Cannon *et al.,* 2008) et de se lier de manière covalente avec les pectines (Qi *et al.,* 1995). L'ensemble de ces données suggère que ces protéines joueraient un rôle important dans la rigidité de la structure pariétale.

Plusieurs fonctions ont été attribuées aux extensines. Ainsi, un mutant dépourvu d'une glycosyltransférase impliquée dans l'ajout de l'arabinose sur le corps protéique présente des défauts d'élongation (Gille *et al.,* 2009). Le gène *LRX1* (*LEUCINE-RICH REPEAT/EXTENSIN 1*) code une protéine contenant un domaine extensine nécessaire à la morphogenèse des poils absorbants chez *A. thaliana* (Baumberger *et al.,* 2001). Des mutations dans les gènes codant des prolyl-4-hydrolases qui définissent les

sites de *O*-glycosylation, provoquent l'inhibition de la croissance des poils absorbants (Velasquez *et al.,* 2011). La *O*-glycosylation a donc un rôle essentiel dans les fonctions des HRGPs (Velasquez *et al.,* 2011). Il a également été suggéré que les extensines participent à l'assemblage de la paroi lors de la formation des plaques cellulaires. Les interactions extensines et pectines formeraient un complexe initiateur afin de poursuivre l'assemblage pariétal (Cannon *et al.,* 2008). Enfin, les extensines participent aux mécanismes de défense (Kieliszewski *et al.,* 2011). En présence d'un pathogène, les proportions de HRGPs et extensines sont augmentées (Esquerré-Tugayé, 1979) et la surexpression d'une extensine endogène réduit considérablement la propagation d'un pathogène virulent (Wei et Shirsat, 2006).

La paroi des tubes polliniques contient aussi des extensines (Rubinstein *et al.,* 1995 ; Sommer-Knudsen *et al.,* 1997). Le gène *PEX1* (*POLLEN EXTENSIN-LIKE 1*) est spécifiquement retrouvé dans le pollen de maïs. Il code une protéine significativement plus riche en motifs (Ser-Hyp_4) que les autres HRGPs (Rubinstein *et al.,* 1995). La protéine est retrouvée dans la paroi interne du tube pollinique avec la callose. Bien que sa fonction exacte n'ait pas été élucidée, il a été suggéré que PEX1 pouvait avoir une fonction dans le développement du tube pollinique (Rubinstein *et al.,* 1995). Des études ultérieures ont montré que le domaine LRR de PEX1 était très conservé et retrouvé chez de nombreuses eudicotylédones et monocotylédones (Stratford *et al.,* 2001) avec un clade spécifique du pollen (Baumberger *et al.,* 2003). Ce domaine pourrait servir de ligand pendant la croissance du tube pollinique (Stratford *et al.,* 2001 ; Baumberger *et al.,* 2003).

Chez *N. tabacum L.*, la fonction des HRGPs, en particulier les extensines, a été étudiée dans la croissance cellulaire des tubes polliniques dans le style (Zhang *et al.,* 2014). En utilisant l'immunohistochimie, les épitopes spécifiques des extensines reconnus par l'anticorps JIM20 (Smallwood *et al.,* 1994) ont été abondamment retrouvés *in-vivo* dans les tubes polliniques et dans le tissu de transmission (Zhang *et al.,* 2014). Un inhibiteur de la synthèse de l'hydroxyproline, la 3,4-déhydro-L proline (3,4-DHP), a été utilisé pour étudier les fonctions des HRGPs. L'ajout de 3,4-DHP a diminué la vitesse de croissance du tube pollinique et raccourci la longueur du style (Zhang *et al.,* 2014). En outre, le dosage de l'hydroxyproline et l'immunolocalisation avec JIM20 ont confirmé que le traitement à la 3,4-DHP avait réduit le contenu en hydroxyproline et en extensines (Zhang *et al.,* 2014). Ces résultats indiquent que les HRGPs, dont

probablement les extensines, peuvent jouer un rôle important dans la croissance cellulaire du tube pollinique et du style (Zhang *et al.,* 2014).

Les arabinogalactanes protéines (AGPs) :

Une classe importante des protéines de la superfamille des HRGPs est celle des AGPs (Reiter, 2002). Leurs études ont été entreprises au début du XIX^{ème} siècle. Elles ont été mises en évidence pour la première fois dans les sécrétions de gommes, surtout de gomme arabique, qui représentent l'une des plus anciennes sources d'arabinogalactanes. Ces arabinogalactanes sont très étudiés du fait de leur utilisation dans de nombreux domaines comme les industries agro-alimentaire et pharmaceutique (Phillips, 2009). C'est notamment le cas pour la gomme arabique d'*Acacia senegal* en tant qu'agent de texture, de gélification et comme émulsifiant facilitant le mélange eau-huile. Les AGPs sont présentes dans tout le règne végétal, aussi bien chez les angiospermes, les gymnospermes que chez les plantes inférieures (bryophytes et algues) (Fincher *et al.,* 1983; Nothnagel, 1997 ; Majewska-Sawka et Nothnagel, 2000).

Les AGPs constituent l'une des familles de macromolécules les plus complexes présentes chez les plantes. Cette complexité provient de la diversité des squelettes protéiques, des *O*-glycanes décorant le squelette protéique et des sucres périphériques décorant les chaînes d'arabinogalactanes. Possédant une partie glucidique pouvant représenter 90% de leur masse moléculaire, elles sont souvent appelées protéoglycanes. Cette partie glucidique est composée majoritairement de D-galactose (D-gal) et L-arabinose (L-ara) (Showalter, 2001).

Les AGPs classiques :

Le corps protéique des AGPs classiques, comme AGP-*Pc*1 du pin (Chen *et al.,* 1994), AGP-*Na*1 du tabac (Du *et al.,* 1994) et AGP1 de la tomate (Li et Showalter, 1996) est constitué de trois domaines : une extrémité N-terminale hydrophobe possédant une séquence avec un signal de sécrétion qui est absente dans la protéine mature, une partie centrale riche en Hydroxyproline/Proline (Hyp/Pro) fortement glycosylée, et une extrémité C-term hydrophobe constituant une hélice transmembranaire à laquelle est liée une ancre GlycosylPhosphatidylInositol (GPI), permettant un ancrage des AGPs dans la membrane plasmique (Figure 11) (Sherrier *et al.,* 1999).

Les AGPs riches en Lys :

Il s'agit d'un petit groupe d'AGPs qui se caractérise par un court domaine de 12 acides aminés riche en Lysine (Lys), non glycosylé et inséré dans le domaine AGP classique (Figure 11). Chez *A. thaliana*, les AGPs riches en Lys représentent la classe la plus étudiée : *At*AGP17 (Nam *et al.,* 1999; Gaspar *et al.,* 2004), *At*AGP18 (Acosta-Garcia et Vielle-Calzada, 2004; Zhang *et al.,* 2011) et *At*AGP19 (Yang *et al.,* 2011). Des protéines homologues ont été trouvées chez d'autres plantes comme *Le*AGP-1 chez la tomate (Sun *et al.,* 2004a; 2004b), *Na*AGP4 chez *N. alata* (Gilson *et al.,* 2001) et *Cs*AGP-1 chez le concombre (Park *et al.,* 2003).

Les AGs peptides :

Après leur première identification chez le blé (Fincher *et al.,* 1974), les AG peptides ont ensuite été identifiés chez *A. thaliana*. Il s'agit de petits peptides de 10 à 13 acides aminés formant une classe unique de molécules (Figure 11). *At*AGP24 contenant 17 acides aminés, est l'un des AG peptides les mieux étudiés. Il n'y a pas de données concernant la fonction de ces AG peptides (Schultz *et al.,* 2002).

Les AGPs de type *fasciclin-like* :

Les *fasciclin-like* AGP (FLA) présentent en plus de leur domaine AGP, un ou deux domaines fasciclines (Johnson *et al.,* 2003). Ces domaines sont homologues aux fasciclines de la drosophile (Elkins *et al.,* 1990) connues pour jouer un rôle majeur dans l'adhésion cellulaire. Les FLA présentent en outre tous les autres domaines caractéristiques des AGPs classiques (Figure 11).

Les AGPs chimériques :

Parmi les AGPs chimériques (Figure 11), il y a les AGPs de type plastocyanine (PAG) et d'autres protéines comme le xylogène, contenant un domaine de transfert de lipide non spécifique et un domaine AGP (Kobayashi *et al.,* 2011).

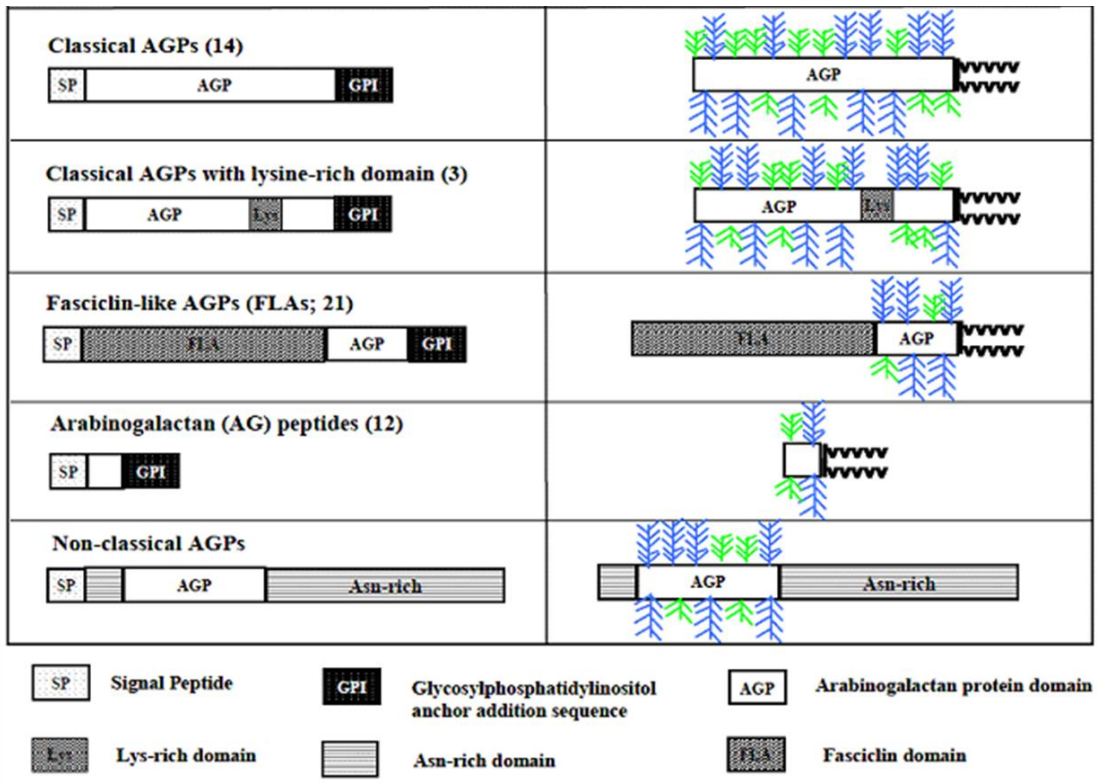


Figure 11 : Représentation schématique de structures putatives des différentes classes d'AGP chez *A. thaliana* (d'après Schultz *et al.,* 2000 et Showalter *et al.,* 2010).
Les ramifications bleues indiquent les AG et les vertes indiquent les arabino-oligosaccharides. La queue en zigzag à l'extrémité des AGP indique l'ancre GPI. Le nombre entre parenthèses indique le nombre de protéines dans chaque classe d'AGP identifiée chez *A. thaliana.*

Dans l'architecture de la cellule, les AGPs interagissent avec les réseaux d'actines et de microtubules (Sardar *et al.,* 2006 ; Nguema-Ona *et al.,* 2007). Les AGPs sont également impliquées dans les interactions avec les microorganismes. Ainsi, la protéine *At*AGP17 est requise pour qu'*A. tumefaciens* (*Agrobactérium tumefaciens)* puisse adhérer à la surface de la racine (Gaspar *et al.,* 2004). Les AGPs participent également à la signalisation (Schultz *et al.,* 1998 ; Sun *et al.,* 2004a et 2004b), à l'expansion des plantules d'*A. thaliana* (Willats et Knox, 1996), au contrôle de la morphologie cellulaire (Andème-Onzighi *et al.,* 2002) ainsi qu'au développement de la plante (Acosta-Garcia et Vielle-Calzada, 2004).

Des études immunocytochimiques ont dévoilé la présence des AGPs dans les tubes polliniques de nombreuses espèces (Jauh et Lord, 1996 ; Mollet *et al.,* 2OO2 ; Pereira *et al.,* 2006 ; Qin *et al.,* 2007 ; Chen *et al.,* 2008 ; Dardelle *et al.,* 2010 ; Coimbra et Pereira, 2012 ; Nguema-Ona *et al.,* 2012). Des marquages de surface sur des tubes polliniques de lys ont montré la présence d'AGPs à l'apex mais aussi tout le long du tube pollinique après un traitement enzymatique avec une pectinase (Jauh et Lord, 1996).

Les AGPs ont la particularité de se lier de façon réversible à un antigène synthétique : le β-D-glycosyl de Yariv (Yariv *et al.,* 1962 ; 1967), permettant ainsi leurs isolements, leurs localisations ainsi que l'étude de leurs fonctions. En effet, l'utilisation de ce réactif a permis la mise en évidence de l'implication des AGPs dans les interactions cellule-cellule : la perturbation des AGPs à l'aide du Yariv phénylglucoside empêche l'interaction cellule-bactérie à la surface de cellules apparentées aux cellules bordantes de la racine d'*A. thaliana* (Vicré *et al.,* 2005). Les tubes polliniques de lys traités au Yariv phénylglucoside ont une croissance inhibée sans que la sécrétion des nouveaux composés pariétaux soit stoppée (Roy *et al.,* 1998). Ce phénomène est réversible si l'on enlève le Yariv du milieu de culture (Mollet *et al.,* 2002). Un nouveau tube émerge alors en arrière de l'apex. Le nouveau site d'émergence peut alors être prédit par la sécrétion localisée de nouveaux AGPs. Ces données suggèrent que les AGPs ont un rôle dans la polarisation initiale et l'élongation des tubes polliniques (Cheung et Wu, 1999 ; Mollet *et al.,* 2002).

Chez *A. thaliana*, les anticorps LM2 utilisés ont également localisé les épitopes spécifiques des AGPs dans l'apex ainsi que dans la zone d'émergence du tube pollinique (Pereira *et al.,* 2006 ; Dardelle *et al.,* 2010). Des analyses transcriptomiques complémentaires ont relevé chez cette même espèce que deux AGPs, codées par *AGP6* et *AGP11*, sont spécifiquement exprimées dans le pollen (Pereira *et al.,* 2006). Le double mutant *agp6/agp11* présente de nombreux grains de pollen avortés (Coimbra *et al.,* 2009). Le taux de germination des grains de pollen est réduit de 80 % par rapport au pollen sauvage et pour ceux qui ont germé, ils présentaient des tubes polliniques ayant des longueurs inférieures de 35 % (Coimbra *et al.,* 2010). La baisse de la fécondité observée dans le double mutant *agp6/agp11* était due à l'avortement des grains de pollen au cours du développement (Coimbra *et al.,* 2009) mais aussi à une germination prématurée des grains de pollen dans les anthères (Coimbra *et al.,* 2010).

Comme précédemment décrit, certaines AGPs sont ancrées à la membrane plasmique grâce à une ancre GPI et peuvent être libérées dans la paroi *via* l'action d'une phospholipase C ou D (PLC ou PLD) (Svetek *et al.,* 1999 ; Takos *et al.,* 2000 ; Gaspar *et al.,* 2001 ; Testerink et Munnik, 2011). Parmi les protéines prédites avec une ancre GPI, 11 seraient "pollen spécifiques" et possiblement associées à la membrane plasmique (Lalanne *et al.,* 2004). Les gènes *SETH1* et *SETH2* (Lalanne *et al.,* 2004) ainsi que *PNT1* (Gillmor *et al.,* 2005) sont impliqués dans les premières étapes de la biosynthèse des

ancres GPI. La mutation de ces gènes affecte la germination du pollen et la croissance des tubes polliniques (Lalanne *et al.,* 2004 ; Gillmor *et al.,* 2005). Ces macromolécules pariétales ont donc un rôle capital dans le développement des tubes polliniques.

Les AGPs sont aussi potentiellement une source de molécules solubles après clivage de l'ancre GPI pouvant servir de signaux. Malgré la rareté des preuves expérimentales, la combinaison des caractéristiques principales des AGPs, à savoir la localisation à la surface cellulaire, leur présence probable dans les radeaux lipidiques de la membrane, une libération contrôlée de la membrane plasmique à des stimuli et la complexité structurale des chaînes osidiques, fait des AGPs, ou des fragments spécifiques d'AGPs, des candidats susceptibles d'exécuter des fonctions de signalisation chez les plantes et dans les processus de reproduction des plantes (Coimbra et Pereira, 2012).

Finalement, les AGPs sont aussi très abondantes dans les tissus femelles. Elles sont retrouvées dans les exsudats du stigmate et dans le tissu de transmission du style chez de nombreuses espèces (Cheung *et al.,* 1995 ; Wu *et al.,* 1995 ; Jauh et Lord, 1996 ; Coimbra et Salema, 1997 ; Coimbra et Duarte, 2003 ; Coimbra *et al.,* 2008). Certaines AGPs seraient impliquées dans le guidage des tubes polliniques (Cheung *et al.,* 1995 ; Wu *et al.,* 1995 ; Coimbra *et al.,* 2007 ; Coimbra *et al.,* 2008 ; Pereira *et al.,* 2014) et lors de l'incompatibilité gamétophytique (Nguema-Ona *et al.,* 2012 ; Costa *et al.,* 2013).

Chez *A. thaliana*, Les AGPs des tissus femelles ont également été étudiées. Une analyse de plusieurs constructions contenant des protéines fluorescentes YFP sous le contrôle de promoteurs de gènes codant pour des AGPs a permis de déterminer la spécificité de leurs expressions. Ainsi, *AGP1* serait exprimé dans le stigmate, le style, le tissu de transmission et certains tissus des ovules. *AGP9* serait présent au niveau des tissus vasculaires, *AGP12* dans les papilles stigmatiques, ovules et dans le septum, et *AGP15* serait exprimé dans tous les tissus du pistil sauf dans le tissu de transmission (Pereira *et al.,* 2014).

3. b. 2. Les protéines riches en proline (PRP) :

Les PRPs représentent une classe de HRGP faiblement glycosylées caractérisée par la présence du motif pentamérique répétitif (Pro-Hyp-Val-Tyr-Lys)n ou ses variantes (Cassab, 1998). Peu de données sur leurs glycosylations sont disponibles dans

la littérature. Leur teneur élevée en Lys leur confère un caractère basique. Du fait de leurs ressemblances avec les extensines, les PRPs pourraient avoir une forme en bâtonnets (Buchanan *et al.,* 2000). Les PRPs présentent aussi une teneur relativement élevée en Tyr qui pourrait leur permettre de former des liaisons covalentes avec d'autres protéines pariétales sous la forme de liaisons di-tyrosine (Brady *et al.,* 1998).

I. 3. c. Les β-glucanes :

Parmi les trois types de β-glucanes mis en évidence, seulement deux sont retrouvés chez *A. thaliana* : la cellulose et la callose. La dernière famille, les "Mixed-Linked Glucans", est spécifique de certaines monocotylédones dont les Poaceae (Sørensen *et al.,* 2008) et est assimilée à la famille des hémicelluloses du fait de leur biosynthèse complexe dans l'appareil de Golgi.

3. c. 1. La cellulose :

La cellulose se compose d'un motif répété de cellobiose (Haworth, 1932), lui-même étant un enchaînement de deux résidus inversés de glucose liés en β-(1-4) (Figure 12).

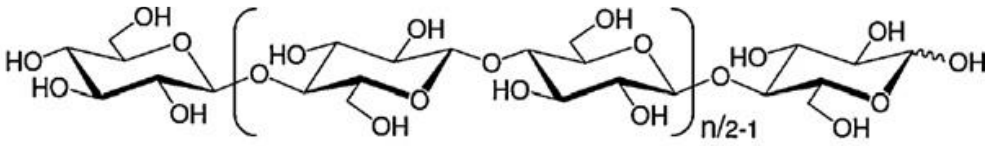


Figure 12 : Modélisation d'un motif de cellobiose.
Répété n fois, le cellobiose constitue la cellulose (n=250 à 7000) (D'après Egusa *et al.,* 2010).

Le degré de polymérisation varie entre 500 et 14000 résidus mais n'excède pas 8000 dans la paroi primaire (Brett, 2000 ; Brown Jr, 2004). Plusieurs chaînes de cellulose s'associent entre elles à l'aide de liaisons faibles (Hydrogène et Van der Waals) pour former des structures paracristallines appelées microfibrilles (Harris *et al.,* 2010). Ces microfibrilles sont synthétisées au niveau de la membrane plasmique par des CELLULOSE SYNTHASES (CESAs). Ces protéines sont à ce jour les seules composantes qui permettent de constituer la cellulose (Somerville, 2006).

Chez les plantes supérieures, elles sont rassemblées sous forme de rosettes, mises en évidence par le groupe de Malcom Brown Jr. (Mueller et Brown Jr, 1980) et

chacune des 6 protéines CESAs synthétise une chaîne glucanique. Cependant, la possibilité que la biosynthèse de la cellulose commence dans l'appareil de Golgi pour les plantes supérieures ne peut être exclue (Guerriero *et al.,* 2010). Ces rosettes sont elles-mêmes regroupées par 6 pour former un total de 36 chaînes qui co-cristallisent en microfibrilles (Figure 13) (Cosgrove, 2005).

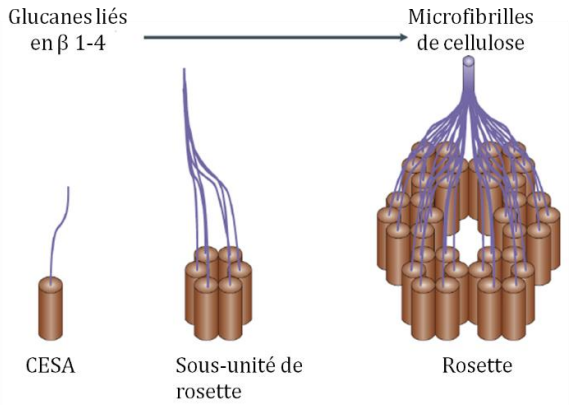


Figure 13 : La formation de la microfibrille de cellulose par les cellulose synthases.
De la synthèse d'une chaîne β-(1-4)-glucane à la formation de la microfibrille de cellulose (Cosgrove, 2005).

Les microfibrilles de cellulose sont longues et rigides. Elles entourent les cellules leur assurant une résistance à la pression de turgescence créée par la vacuole. C'est cette pression qui permet le port dressé des végétaux jeunes et herbacés (Cosgrove, 2005 ; Somerville, 2006). Par conséquent, la cellulose possède un rôle central dans la régulation du volume cellulaire et la détermination de la forme et de la taille de la cellule végétale (Bessueille et Bulone, 2008).

Différentes familles multigéniques sont impliquées dans la biosynthèse de la cellulose. Dans le génome d'*A. thaliana*, dix gènes codant pour des CESAs ont été trouvés et des études sur des mutants ont montré qu'ils jouaient des rôles distincts lors du processus de synthèse de la cellulose (Richmond, 2000 ; Doblin *et al.,* 2002). Une autre famille multigénique, les *CSLD*s (pour "CELLULOSE SYNTHASE LIKE-D"), proche des CESAs, semble également impliquée dans la biosynthèse de la cellulose et contient 6 membres chez *A. thaliana* (Richmond et Somerville, 2001 ; Bernal *et al.,* 2008).

Chez le tabac, *NaCSLD1* (*N. alata CELLULOSE SYNTHASE-LIKE D1*) serait exclusivement exprimée dans les anthères et dans les tubes polliniques cultivés *in-vitro* et coderait pour une cellulose synthase dans le pollen (Doblin *et al.,* 2001). Chez le riz, le

génome contient 7 gènes codants pour des CESAs et 5 gènes codants pour des CSLDs (Li *et al.,* 2009 ; Wang *et al.,* 2011).

Perturber la cellulose lors de la mise en place des plaques cellulaires, comme montré chez le mutant *korrigan* (*kor*) déficient en une endo-glucanase, induit la formation de parois incomplètes, avec des cellules polynucléées aboutissant à des plantules sévèrement affectées dans leurs morphologies (Zuo *et al.,* 2000).

Malgré sa faible abondance (Schlüpmann *et al.,* 1994), la cellulose est présente le long de la paroi des tubes polliniques et joue un rôle important dans la stabilisation de la paroi spécialement dans la zone de transition entre l'apex et le reste du tube (Geitmann, 2010). Les microfibrilles de cellulose sont orientées de façon oblique le long de la paroi des tubes polliniques du pin (Derksen *et al.,* 1999) contre une orientation plus longitudinale observée chez le lys, *Solanum chacoense* et *A. thaliana* suggérant que les microfibrilles de cellulose ne sont pas les seuls composants ayant un rôle contre la pression de turgescence (Aouar *et al.,* 2010 ; Lehner *et al.,* 2010 ; Chebli *et al.,* 2012 ; Cai *et al.,* 2015 ; Hepler et Winship, 2015). Des traitements avec de la cellulase ou avec des molécules qui inhibent la synthèse de la cellulose comme le 2,6-dichlorobenzonitrile (DCB) produisent des tubes polliniques avec un diamètre plus grand et induisent un gonflement de l'apex voire un éclatement des tubes (Aouar *et al.,* 2010 ; Anderson *et al.,* 2002 ; Hao *et al.,* 2013) comme observé avec les mutants *csld1* et *csld4* (Wang *et al.,* 2011).

3. c. 2. La callose :

La biosynthèse de la callose est peu étudiée car elle est en général constitutivement peu abondante dans la paroi des plantes mise à part dans les tubes criblés du phloème (Xie *et al.,* 2011), le pollen et les tubes polliniques (Parre et Geitmann, 2005b) et dans la plaque cellulaire lors des divisions (Chen et Kim, 2009). La formation de la callose intervient dans de nombreux processus de la plante, tels que le renforcement de la paroi suite à l'application de stress biotique et abiotique (Chen et Kim, 2009). La synthèse de la callose est ainsi observée lorsque la plante est exposée aux ions métalliques comme le cadmium et l'aluminium (Sivaguru *et al.,* 2000 ; Ueki et Citovsky, 2002), à des pathogènes (Nishimura *et al.,* 2003) ou en cas de blessures

(Jacobs *et al.,* 2003). La callose régulerait aussi les mouvements de molécules entre les cellules en contrôlant la taille des pores des plasmodesmes (Zavaliev *et al.,* 2011).

La callose est un polysaccharide formé d'un enchaînement de résidus glucoses reliés par des liaisons en β-(1-3). Certains résidus glucosyles liés en β-(1-6) peuvent aussi être trouvés (Chen et Kim, 2009). Cette longue chaîne se conforme sous la forme d'une hélice, laquelle est capable de s'associer avec une, voire deux autres chaînes de même nature. La biosynthèse de la callose se fait au niveau de la membrane plasmique. Il avait été proposé que la synthèse de la cellulose et de la callose soit catalysée par une seule et même enzyme (Verma et Hong, 2001). Cependant, cette hypothèse a été réfutée suite à la découverte de gènes codant spécifiquement des callose synthases (CALS) (Hong *et al.,* 2001 ; Verma et Hong, 2001).

Parmi les 12 gènes codant pour les callose synthases, *CALS5* est exprimé dans le pollen. En effet, CALS5 est impliquée dans le dépôt de callose dans les grains de pollen et participe également à la formation de l'exine du grain de pollen (Nishikawa *et al.,* 2005 ; Dong *et al.,* 2005) mais des données contradictoires ont été obtenues concernant la viabilité des grains de pollen et la capacité des tubes polliniques à grandir normalement. *NaGSL1* (*N. alata GLUCAN SYNTHASE-LIKE 1*) serait une callose synthase (Brownfield *et al.,* 2007), impliquée dans le contrôle de la synthèse de la callose durant la croissance du tube pollinique chez le tabac (Brownfield *et al.,* 2008). Récemment, l'étude d'un mutant *cdm1*, mutant d'insertion pour le gène *CDM1* (*CALLOSE DEFECTIVE MICROSPORE 1*), a montré une stérilité totale en raison de la dégénérescence des microspores due à une déposition anormale de la callose (Lu *et al.,* 2014).

En 2011, une étude a montré que les orthologues de *CALS5* sont exprimés dans les grains de pollen de plusieurs angiospermes et gymnospermes mais *CALS5* est principalement exprimé dans les tubes polliniques à croissance rapide (c.à.d. les angiospermes), suggérant que CALS5 joue des rôles différents mais cruciaux durant la formation du pollen et/ou la germination et la croissance des tubes polliniques (Abercrombie *et al.,* 2011). En effet, en se basant sur la variabilité et le dépôt transitoire de la callose chez les gymnospermes et en particulier le pin dont les tubes polliniques croissent très lentement, Pacini *et al.,* (1999) avaient proposé que la callose n'avait pas de fonction structurale chez ces organismes mais servait plutôt de réserve de polysaccharides. A l'inverse, chez les tubes polliniques à croissance rapide comme

Solanum chacoense et *Lilium orientalis*, la callose aurait une fonction mécanique importante (Parre et Geitmann, 2005a).

La callose n'est pas répartie uniformément dans la paroi des tubes polliniques (Figure 14). Ainsi, les tubes polliniques chez de nombreuses espèces (Li *et al.,* 1995 ; Roy *et al.,* 1997 ; Ferguson *et al.,* 1998 ; Lennon et Lord, 2000 ; Derksen *et al.,* 2002 ; Bove *et al.,* 2008 ; Moscatelli et Idilli, 2009 ; Dardelle *et al.,* 2010 ; Guerriero *et al.,* 2014) possèdent deux couches en arrière de la zone apicale, une interne enrichie en callose et une externe fibrillaire (Figure 14). A l'inverse, dans la région apicale, une seule couche est présente et ne contient pas, en condition normale, de callose.

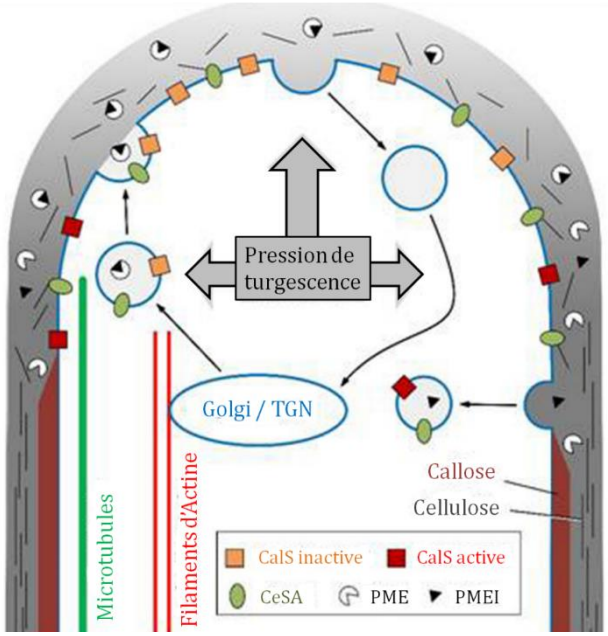


Figure 14 : Schéma de principe du processus de sécrétion dans des tubes polliniques. Seuls les éléments impliqués dans la synthèse de la paroi cellulaire sont représentés (PME, PMEI, CESA, CALS). Le gradient de gris dans la paroi du tube indique l'état de méthyl-estérification des pectines (gris clair: pectine entièrement méthyl-estérifiée; gris foncé: pectine acide). La cellulose est représentée par des lignes noires organisées de façon aléatoire dans la paroi de l'apex du tube et plus organisées dans la paroi externe dans la partie distale. La callose est représentée en marron dans la paroi interne des tubes polliniques. TGN, Réseau trans-golgien. Les filaments d'actine (lignes rouges) sont présentés comme interagissant avec l'appareil de Golgi, ce qui indique qu'ils sont impliqués dans le transport des vésicules. Les microtubules (lignes en vert) sont localisés dans la région corticale où ils pourraient probablement interagir avec les CALS et CESA. Les vésicules de sécrétion ne fusionnent pas exactement à la pointe du tube mais dans une région subapicale. Les processus d'endocytose pourraient se produire à la fois à l'extrême pointe et dans les régions plus distales du tube. D'après Guerriero *et al.,* 2014.

Afin de déterminer si la callose est capable de fournir une résistance mécanique contre un stress de compression, des tubes polliniques ont été traités avec une lyticase (cocktail enzymatique capable de dégrader notamment les β-(1-3)-glucanes) et soumis à la déformation locale par microindentation (Parre et Geitmann, 2005a). Les données ont révélé que la réduction de la quantité de callose entraînait une réduction de la rigidité cellulaire et une augmentation de la viscoélasticité. Ces résultats suggèrent que la callose est capable de résister à une contrainte de compression et peut jouer un rôle mécanique dans les cellules végétales en croissance (Parre et Geitmann, 2005a).

I. 3. d. Les hémicelluloses :

Les hémicelluloses présentes chez les végétaux peuvent être de différentes natures. On comptabilise à ce jour de nombreux polymères appartenant à cette famille de polysaccharides. Parmi les plus abondants, on retrouve les xylanes, arabinoxylanes, les mannanes, les glucomannanes, les β-(1-3,1-4)-glucanes (*mixed-linkage glucans*) ainsi que les xyloglucanes (XyGs) (Scheller et Ulvskov, 2010). Les polymères hémicellulosiques s'associent à la cellulose par des liaisons non covalentes et permettent ainsi aux microfibrilles cellulosiques d'être indirectement, mais solidement reliées les unes aux autres (McCann *et al.,* 1990 ; Scheller et Ulvskov, 2010). Ces polymères peuvent également établir des liaisons covalentes avec les pectines acides (Thompson et Fry, 2000).

Les hémicelluloses sont plus ou moins spécifiques d'une famille et/ou de l'origine de la paroi (primaire, secondaire ou graine). Les XyGs sont les hémicelluloses les plus abondantes de la paroi primaire chez les eudicotylédones. Ce polymère est constitué d'une chaine principale β-D-Glcp liés en (1-4) pouvant être ramifiée en 0-6, par des chaines latérales de natures diverses (Figure 15) contenant des résidus xylose, galactose et fucose chez la majorité des angiospermes (fucogalactoxyloglucanes) à l'exception des Lamiids (dont les Solanacées font parti) où le fucose est remplacé par l'arabinose (Fry, 2011). On parle alors d'arabinoxyloglucanes. Afin d'aider à la description des différentes structures, Fry et collaborateurs (1993) ont développé une nomenclature avec une lettre correspondant aux structures suivantes : G = β-D-Glcp non substitué ; X = α-D-Xylp-(1-6)-β-D-Glcp ; S = X substitué par un α-L-Araf-(1-2) et L = X substitué par un β-D-Galp-(1-2) et F = L substitué par un α-L-Fucp (Figure 15).

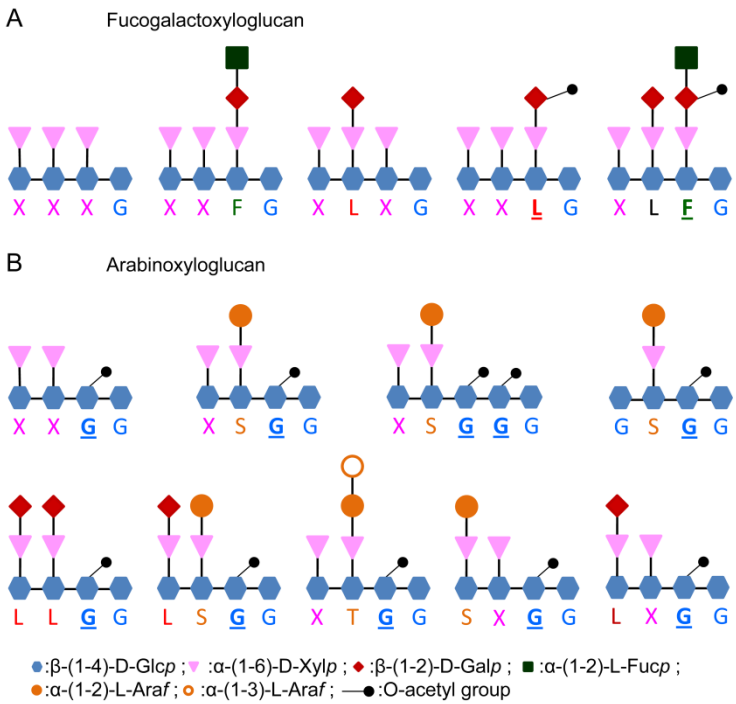


Figure 15 : Représentation schématique des principaux motifs de XyGs et leurs nomenclatures d'après Dardelle *et al.* (2015).

Les épitopes associés aux XyGs sont détectés tout le long du tube pollinique d'*A. thaliana* (Figure 16) et principalement dans la paroi externe fibrillaire (Dardelle *et al.,* 2010). L'analyse biochimique par spectrométrie de masse MALDI-TOF des XyGs après traitement par une endo-glucanase de la paroi cellulaire des tubes polliniques a révélé deux oligosaccharides dominants mono *O*-acétylés (XLXG / XXLG et XXFG) qui représentent plus de 68% des ions totaux (Dardelle *et al.,* 2010). Ces résultats démontrent que la paroi du tube pollinique d'*A.thaliana* a ses propres caractéristiques en comparaison avec d'autres types d'organes du sporophyte d'*A. thaliana* (Dardelle *et al.,* 2010). En effet, les principaux fragments de XyG libérés après un traitement à l'endo-glucanase de la paroi cellulaire des organes végétatifs d'*A. thaliana* sont généralement XXXG, XXLG / XLXG, XXFG, et XLFG (Zablackis *et al.,* 1995 ; Lerouxel *et al.,* 2002 ; Nguema- Ona *et al.,* 2006 ; Obel *et al.,* 2009).

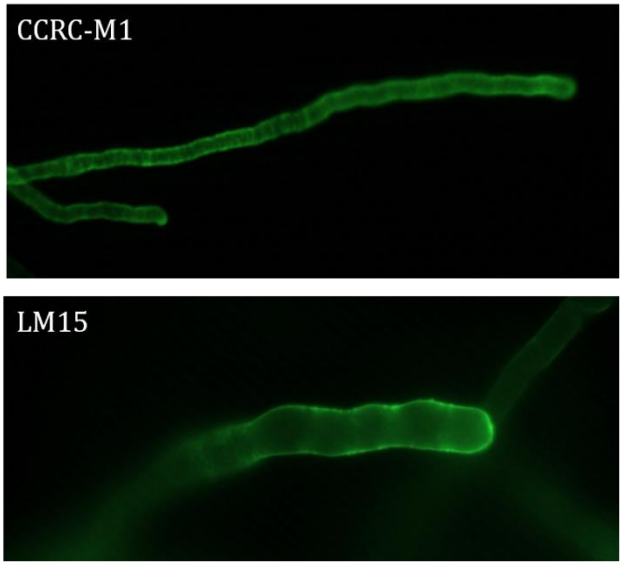


Figure 16 : Immunomarquages des épitopes associés aux XyGs non fucosylés (motif XXXG) et fucosylés avec les anticorps LM15 and CCRC-M1, respectivement. D'après Dardelle *et al.* (2010).

Plus surprenant, des XyGs fucosylés ont également été retrouvés dans les tubes polliniques de *N. alata* (Lampugnani *et al.,* 2013) et de plusieurs espèces de tomate (Dardelle *et al.,* 2015) alors que les XyGs analysés dans les organes végétatifs de la famille des Solanacées ne sont pas fucosylés mais arabinosylés. Ces observations semblent indiquer que la fucosylation des XyGs dans la paroi des tubes polliniques aurait un rôle important.

I. 3. e. Les pectines :

Les pectines sont avec les XyGs, les polysaccharides complexes les plus abondants de la paroi primaire. Elles constituent 40 % de la paroi primaire chez *A. thaliana* (Liepman *et al.,* 2010). Les pectines sont majoritairement retrouvées dans la lamelle moyenne, assurant ainsi la cohésion entre les cellules végétales, et dans la paroi primaire. Plusieurs polymères composent cette famille (Figure 17).

Chez *A. thaliana*, il avait été caractérisé trois domaines distincts : les homogalacturonanes (HG), les rhamnogalacturonanes de type I et II (respectivement RG-I et RG-II) (Zablackis *et al.,* 1995). Mais ce n'est que bien plus tard que le xylogalacturonane (XG) a été identifié chez *A. thaliana* (Zandleven *et al.,* 2007). Par la suite, d'autres composés pectiques ont été caractérisés chez la lentille d'eau comme l'apiogalacturonane (Schols *et al.,* 1995 ; Hart et Kindel, 1970).

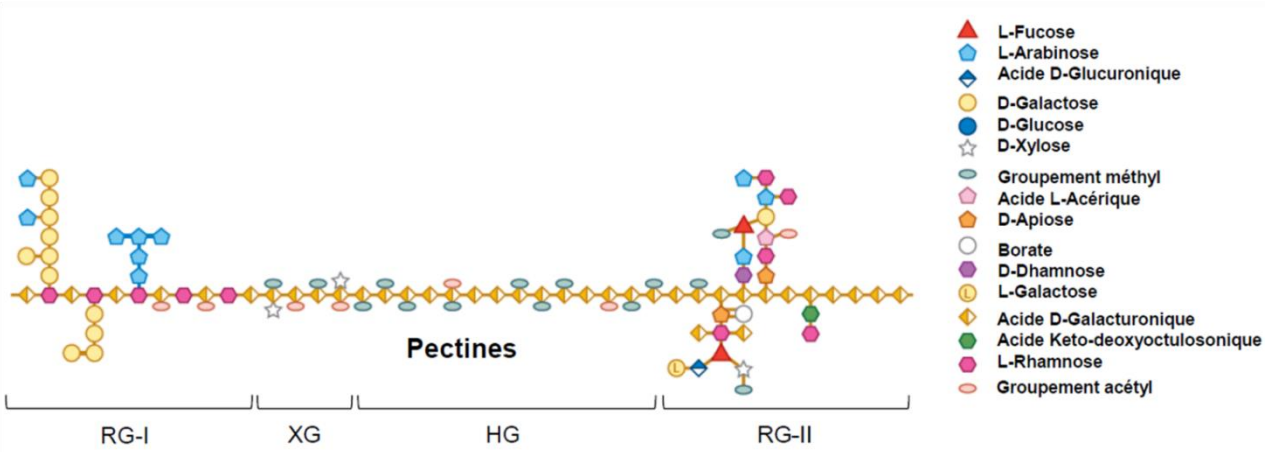


Figure 17 : Structure des principaux constituants des parois de type I et vue de détail des polysaccharides pectiques majeurs.
Représentation schématique des xyloglucanes (XyG), des rhamnogalacturonanes de type I et II (RG-I et RG-II), des homogalacturonanes (HG) et des xylogalacturonanes (XG), d'après Wolf *et al.* (2012a).

De nombreuses revues récentes décrivent la composition, la biosynthèse et les fonctions des pectines (Scheller *et al.,* 2007 ; Mohnen, 2008 ; Caffal et Mohnen, 2009 ; Harholt *et al.,* 2010 ; Fry, 2011) notamment lors de la morphogénèse des plantes (Palin et Geitmann, 2012). On estime que pas moins de 67 glycosyl-, méthyl- et acétyltransférases sont nécessaires pour l'élaboration des structures pectiques (Mohnen, 2008 ; Atmodjo *et al.,* 2013) en plus des transporteurs et des enzymes d'interconversion de nucléotides sucres (Sandhu *et al.,* 2009 ; Folley-Gueye *et al.,* 2012). Leurs biosynthèses sont effectuées dans tous les compartiments de l'appareil de Golgi (cis, median et trans) puis ceux-ci sont sécrétés *via* des vésicules de sécrétions golgiennes (Driouich *et al.,* 1993 ; Staehelin et Moore, 1995 ; Caffall et Mohnen, 2009 ; Chevalier *et al.,* 2010 ; Driouich *et al.,* 2012).

3. e. 1. Le rhamnogalacturonane de type I (RG-I) :

Le RG-I consiste en une chaîne principale du motif répété [α-(1-4)-GalA-α-(1-2)-Rha] sur laquelle des ramifications de chaînes α-(1-5)-arabinanes, β-(1-4)-galactanes et/ou arabinogalactanes de type I peuvent être trouvées en position C-4 des résidus rhamnoses (Figure 17) (Harholt *et al.,* 2010). Le RG-I semble participer à la rigidification de la paroi. En effet, une paroi riche en chaînes galactanes sera deux fois plus rigide qu'une paroi dépourvue de ces chaînes (McCartney *et al.,* 2000).

Le RG-I est également présent dans la paroi cellulaire des tubes polliniques. Le marquage avec les anticorps LM6 et/ou LM13, reconnaissant des épitopes associés aux arabinanes (Willats *et al.,* 1998), et LM5 reconnaissant des épitopes associés aux galactanes (Jones *et al.,* 1997), est réparti uniformément le long de l'ensemble du tube pollinique chez *A. thaliana* (Dardelle *et al.,* 2010), *A. deliciosa* (Abreu et Oliveira, 2004) et chez *P. wilsonii* (Chen *et al.,* 2008). Deux autres anticorps monoclonaux (INRA-RU1 et RU2-INRA) ont été mis en évidence comme étant spécifiques de la chaine principale du RG-I (Ralet *et al.,* 2010). En microscopie électronique, les arabinanes sont principalement détectés dans la couche externe de la paroi cellulaire des tubes polliniques chez *A. thaliana* (Dardelle *et al.,* 2010). De plus, l'analyse biochimique de la paroi cellulaire des tubes polliniques d'*A. thaliana* a révélé une teneur importante en résidus arabinose (43%) provenant essentiellement des α-(1-5)-L-arabinanes des RG-I. Des compositions similaires ont été observées dans la paroi des tubes polliniques de *N. alata* (Lampugnani *et al.,* 2013).

La raison de l'abondance des arabinanes dans la paroi des tubes polliniques n'est pas connue. Cependant, chez *A. thaliana*, un double mutant KO (*knock-out*) pour deux *RGPs* (*REVERSIBLY GLYCOSYLATED PEPTIDEs*) (*RGP1* et *RGP2*) présente une forte altération de l'intine et une létalité du pollen (Drakakaki *et al.,* 2006). Ces RGPs présentent une forte homologie (~80%) avec la séquence protéique d'une UDP-arabinopyranose mutase chez le riz impliquée dans l'interconversion de l'UDP-Arap et de l'UDP-Araf (Konishi *et al.,* 2007 ; Rautengarten *et al.,* 2011). Bien que l'analyse de la paroi des grains de pollen n'ait pas été entreprise afin de vérifier que les arabinanes des RG-I étaient affectés, les résultats suggèrent que RGP1 et RGP2 agissent de façon redondante durant le développement du pollen et pourraient être impliquées dans la synthèse des arabinanes lors de la maturation du pollen (Drakakaki *et al.,* 2006).

3. e. 2. Le rhamnogalacturonane de type II (RG-II) :

Le RG-II ne contient pas de rhamnose sur sa chaine principale. Il s'agit en fait d'un squelette d'acide homogalacturonique sur lequel vient se substituer cinq chaînes latérales notées A à E. Ces oligosaccharides sont composés de 12 monosaccharides différents dont certains sont rares tels que l'apiose (Api), l'acide 3-déoxy-D-lyso-heptulosarique (Dha), l'acide 3-déoxy-D-manno-octulosonique (Kdo) ou encore l'acide

acérique (Ace) (Figure 17) (Whitcombe *et al.,* 1995 ; Pérez *et al.,* 2003 ; Dumont *et al.,* 2014).

L'un de ces monosaccharides, l'apiose de la chaine A, permet au RG-II de former des dimères par l'intermédiaire d'un pont diester de borate (Kobayashi *et al.,* 1996 ; O'Neill *et al.,* 1996 ; Vidal *et al.,* 2001; Matsunaga *et al.,* 2004) qui contribuerait à la rigidification de la paroi. Chez le mutant *mur1-1* (*murus1-1*) et *gme* (GDP-d-mannose 3, 5-epimérase), l'absence respective de fucose ou de L-galactose provoque une diminution de cette dimérisation et induit un phénotype nain (O'Neill *et al.,* 1996, 2001, 2004 ; Voxeur *et al.,* 2011). Dans les deux cas, la complémentation de ces mutants avec du bore restaure le phénotype sauvage suggérant que le développement de la plante dépend de l'organisation du réseau pectique et de la dimérisation du RG-II (O'Neill *et al.,* 2001 ; Voxeur *et al.,* 2011 ; 2012). De même, l'absence d'acide glucuronique sur la chaîne A du RG-II altère la dimérisation et entraine une perte d'adhésion des cellules en suspension chez le tabac (Iwai *et al.,* 2002).

Des immunomarquages utilisant un anticorps reconnaissant les formes monomérique et dimérique du RG-II semblent indiquer que le RG-II est présent dans la paroi des tubes polliniques du lys (Matoh *et al.,* 1998), de la tomate, du tabac et *d'A. thaliana* (Dumont *et al.,* 2014). La détection par GC-MS d'un des sucres à 8 carbones spécifiques du RG-II, le Kdo, dans un extrait pariétal de tubes polliniques d'*A. thaliana* a été la première preuve biochimique de la présence de ce motif pectique dans la paroi des tubes polliniques (Dumont *et al.,* 2014). Cependant, aucune évidence ne permet de déterminer s'il se trouve sous forme monomérique ou dimérique.

L'étude de l'implication hypothétique du RG-II dans la croissance des tubes polliniques est très récente. En 2006, il a été démontré chez le tabac, que la mutation de *NpGUT1* (*Nicotiana plumbaginifolia GLUCURONOSYLTRANSFERASE1*) induit une inhibition de l'élongation du tube pollinique, probablement due à un dépôt anormal de RG-II et du bore dans la paroi (Iwai *et al.,* 2006). Cependant, ces résultats sont controversés puisque des résultats ultérieurs ont montré chez *A. thaliana* que les protéines IRX10 (IRREGULAR XYLEM 10) et IRX10-L (IRREGULAR XYLEM 10-LIKE) qui sont très proches de *Np*GUT1 joueraient un rôle primordial dans la synthèse des glucuronoxylanes et non du RG-II (Wu *et al.,* 2009 ; Brown *et al.,* 2009).

Chez *A. thaliana*, 5 autres gènes impliqués dans la biosynthèse du RG-II ont permis de démontrer que ce motif était important pour l'élongation du tube pollinique. Les KDO-8-P SYNTHASEs (*At*KDSA1 et *At*KDSA2) seraient impliquées dans la synthèse du Kdo. Le double mutant *Atkdsa1* et *Atkdsa2* présente des grains de pollen incapables d'avoir une élongation convenable de leurs tubes polliniques et qui de ce fait ne peuvent permettre la fécondation (Delmas *et al.,* 2008). L'étude du mutant dont le gène coderait pour la CTP:Kdo cytidylyltransferase (CMP:Kdo Synthetase, CKS) mitochondriale, responsable de l'activation du Kdo comme un sucre nucléotidique avant son incorporation dans le RG-II, n'a pas permis d'obtenir des lignées homozygotes (Kobayashi *et al.,* 2011). Chez le mutant hétérozygote, il est observé une inhibition de l'élongation des tubes polliniques qui rend la plante stérile (Kobayashi *et al.,* 2011). Finalement, l'étude de deux mutants *mgp* (*male gametophyte defective*) et d'un mutant *sia2* (*sialyltransferase-like2*) a permis de conforter l'idée que l'altération de la biosynthèse du RG-II dans le pollen impacte la croissance du tube pollinique. Le *mgp4*, mutant KO pour une xylosyltransferase du RG-II (Liu *et al.,* 2011) ainsi que le *mgp2*, mutant KO pour une sialyltransferase-like 1 (Deng *et al.,* 2010) et *sia2+/-* (Dumont *et al.,* 2014) présentent des phénotypes similaires avec une forte inhibition de la germination du pollen ainsi qu'un retard de croissance des tubes polliniques *in-vitro* et *in-vivo* comparé au sauvage. Ces SIAs seraient responsables du transfert de sucres de structure proche de l'acide sialique, le Kdo et/ou le Dha.

L'ensemble de ces données semble indiquer que le RG-II joue un rôle primordial dans la croissance du tube pollinique. Néanmoins, il est à noter dans ces études, l'absence d'analyse biochimique montrant que la structure du RG-II était affectée.

3. e. 3. Le xylogalacturonane :

Le xylogalacturonane possède une chaîne principale du type HG où des résidus xyloses sont substitués en position C-3 de certains acides galacturoniques (Figure 17).

Une étude immunocytochimique avec l'anticorps LM8, spécifique des épitopes associés aux xylogalacturonanes (Willats *et al.,* 2004), a permis la mise en évidence de ce motif pectique chez les tubes polliniques d'*A. thaliana* (Dardelle *et al.,* 2010). Chez *A. thaliana*, le gène At5g33290 serait impliqué dans la synthèse du xylogalacturonane, mais le mutant *xgd1* (*xylogalacturonan deficient 1*) ne présente aucun phénotype visible au

niveau de son grain de pollen ou de ses tubes polliniques (Jensen *et al.,* 2008). Ceci suggère que d'autres gènes sont impliqués dans la biosynthèse du XG dans le pollen, mais ils n'ont pas encore été caractérisés.

3. e. 4. Les homogalacturonanes :

Les homogalacturonanes se composent de chaînes d'acides galacturoniques (GalA) liés en α-(1-4). Cette famille est la plus abondante car elle représente environ 65 % des pectines totales. Ce polymère peut être méthyl-estérifié sur le carbone 6 et O-acétylé en position 0-2 et 0-3 (Figure 17). D'ailleurs, c'est sous la forme fortement méthyl-estérifiée que les HGs sont synthétisés dans l'appareil de Golgi, où seraient localisées des protéines possédant un domaine méthyltransférase putative (Mouille *et al.,* 2007). Dans la paroi, ces groupements méthyles peuvent être éliminés sous l'action de pectines méthyl-estérases (PMEs) pour aboutir à la formation de groupements carboxyliques sur le C-6.

Selon les conditions de pH et la régulation ionique, les pectines vont subir, soit une dé-méthyl-estérification partielle et aléatoire, soit en bloc. Dans le premier cas, les HGs seraient alors sensibles aux endo-polygalacturonases, favorisant un relâchement de la paroi. Dans le second cas, les charges négatives contigües établies par les groupements carboxyles (COO^-) pourront réagir avec des ions Ca^{2+} (Ralet *et al.,* 2008) permettant l'association de plusieurs chaines HGs (Figure 18). Cette association établit la structure dite "boîte à œufs" (Jarvis *et al.,* 2003 ; Micheli, 2001 ; Pelloux *et al.,* 2007). En établissant des structures "boîte à œufs", les HGs se lient entre eux et rigidifient la paroi (Micheli, 2001 ; Pelloux *et al.,* 2007).

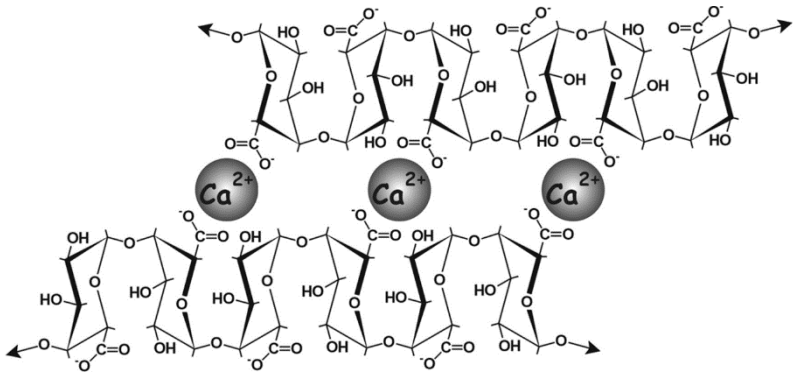


Figure 18 : Représentation schématique de la structure "boîte-à-œufs" ; plusieurs chaines d'HGs peuvent interagir par des ions Ca^{2+} (Vincken *et al.,* 2003).

Des études d'immunomarquages sur les tubes polliniques avec des MAbs reconnaissant des épitopes associés aux HGs faiblement méthyl-estérifiés (JIM5) ou fortement méthyl-estérifiés (JIM7) montrent que ces pectines ont une distribution spatiale caractéristique chez de nombreuses espèces (Li *et al.,* 1994), avec les HGs fortement méthyl-estérifiés localisés principalement dans la zone apicale (lieu de sécrétion des HGs, Figure 19) et les HGs faiblement méthyl-estérifiés en arrière (Figure 19) suggérant l'action de PMEs (Bosch et Hepler, 2005 ; Dardelle *et al.,* 2010 ; Lehner *et al.,* 2010, Chebli *et al.,* 2012 ; Mollet *et al.,* 2013).

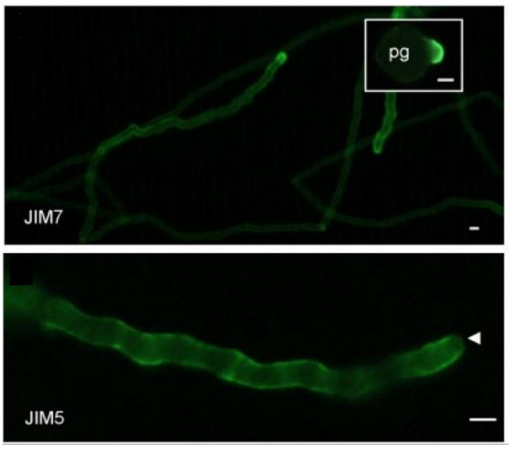


Figure 19 : Immunomarquages de tubes polliniques d'*A.thaliana* cultivés *in-vitro* durant 6 h. Les épitopes de la paroi du tube pollinique ont été marqués avec des anticorps monoclonaux anti-pectine JIM7 et JIM5. Ceux-ci sont spécifiques des HGs fortement et faiblement méthyl-estérifiés, respectivement (Dardelle *et al.,* 2010). pg : Grain de pollen, flèche : apex du tube pollinique.

La synthèse des HGs nécessite des enzymes telles que les GAUTs (GALACTURONOSYL TRANSFERASES). GAUT1 a été la première identifiée chez *A. thaliana* (Bacic, 2006 ; Sterling *et al.,* 2006). Celle-ci est une protéine membranaire de type II localisée dans l'appareil de Golgi, et permet l'élongation des oligogalacturonides dans la configuration α-1,4 (Sterling *et al.,* 2006). Outre les GAUTs, il y a également les GATLs (GALACTURONOSYL TRANSFERASE-LIKE) qui sont impliquées dans la synthèse des pectines. Le génome d'*A. thaliana* contiendrait 13 *GAUTs* et 8 *GATLs* exprimés dans les inflorescences d'*A. thaliana* (Caffall et Mohnen, 2009 ; Kong *et al.,* 2011).

L'inactivation de *QUASIMODO1/GAUT8* induit une réduction des épitopes associés aux HGs, une diminution de la quantité de GalA dans la paroi des cellules végétatives et un phénotype stérile partiel (Bouton *et al.,* 2002). En accord avec les données de transcriptomique, seulement deux *GAUTs* (*GAUT13* et *GAUT14*) et deux

GATLs (*GATL4* et *GATL7*) sont exprimées dans les tubes polliniques (Qin *et al.,* 2009 ; Kong *et al.,* 2011 ; revue par Mollet *et al.,* 2013). L'expression de *GATL4* semble être spécifique du pollen et des tubes polliniques d'*A. thaliana*, ce qui suggère l'implication de ce gène dans la synthèse des HGs dans les tubes polliniques (Kong *et al.,* 2011). Cependant des études fonctionnelles sont nécessaires pour prouver le rôle de ce gène dans la biosynthèse des HGs. Wang *et al.,* (2013) ont fait la caractérisation fonctionnelle chez *A. thaliana* des deux gènes putatifs *GAUT13* et *GAUT14*. Les mutants d'insertion d'ADN-T, *gaut13* et *gaut14*, ne présentent pas de défauts observables, mais les doubles mutants *gaut13/gaut14* montrent des défauts importants lors de la croissance des tubes polliniques. 35,2 à 37,3 % des tubes polliniques des doubles mutants hétérozygotes étaient enflés et ne présentaient pas de croissance. En outre, la distribution des HGs marqués avec JIM5 et JIM7 dans la paroi du tube pollinique du double mutant était modifiée de façon significative par rapport au type sauvage (Wang *et al.,* 2013). Ces résultats suggèrent que *GAUT13* et *GAUT14* fonctionnent de façon redondante lors de la croissance du tube pollinique et pourraient participer à la synthèse des HGs de la paroi du tube pollinique (Wang *et al.,* 2013). Néanmoins, des analyses biochimiques complémentaires sont nécessaires afin de déterminer chez les doubles mutants si le contenu en HG est réduit.

I. 3. f. Les protéines de remodelage de la paroi :

De nombreuses protéines de remodelage de la paroi ont été décrites. Ainsi, on peut noter les protéines impliquées dans le remodelage du réseau cellulose/XyG comme les expansines (EXPs) et les XyG endo-transglucosylase hydrolases (XTHs), celles impliquées dans la dégradation des polysaccharides appartenant à la famille des glycosides hydrolases (GHs) comme les glucanases, glucosidases, galactosidases, xylosidases, arabinosidases… et finalement, celles impliquées dans le remodelage des HGs comme les pectate lyases (PLs), polygalacturonases (PGases) et pectines méthylestérases (PMEs) (Figure 20). Ces protéines de remodelage peuvent être produites par le pollen lui-même mais dans un contexte *in-vivo* peuvent aussi émaner des tissus femelles facilitant ainsi la progression des tubes polliniques (Figure 20).

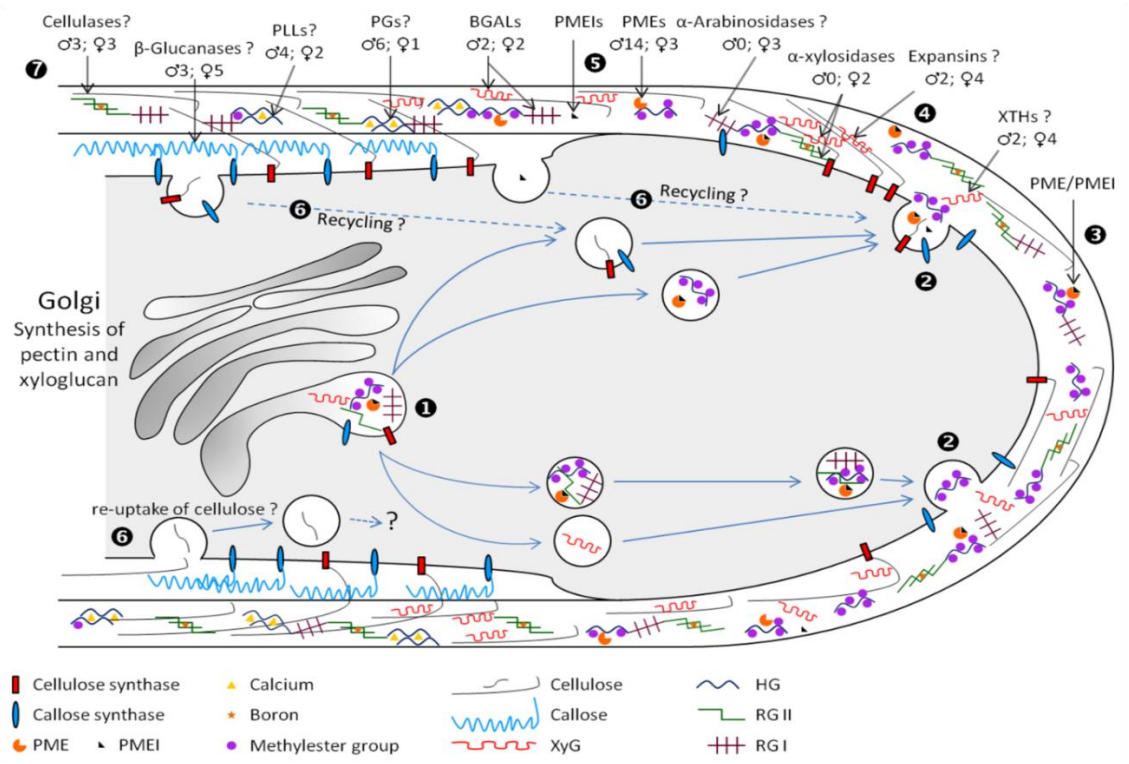


Figure 20 : Modèle présentant le dépôt des principaux polysaccharides dans la paroi cellulaire du tube pollinique et son remodelage possible avec les protéines provenant du tube pollinique ou du pistil.
Les principales classes d'enzymes (cellulases, β-glucanases, pectate lyases (PLs), polygalacturonanes (PGases), β-galactosidases (BGALs), pectines méthylestérases (PMEs), α-arabinosidases, α-xylosidases, expansines et XyG endo-transglucosylase hydrolases (XTHs) potentiellement impliquées dans le remodelage et / ou dans la dégradation de la paroi cellulaire du tube pollinique sont présentées. Le nombre correspond au nombre de gènes fortement exprimés dans le pistil (♀) et le tube pollinique (♂) chez *A. thaliana*. HG, homogalacturonan ; RG-I, rhamnogalacturonane-I ; RG-II, rhamnogalacturonane-II ; XyG, xyloglucanes (Mollet *et al.,* 2013).

3. f. 1. L'expansion cellulaire : remodelage des xyloglucanes et de la cellulose :

Les expansines :

Les expansines ont été découvertes dans les hypocotyles de concombre (McQueen-Mason *et al.,* 1992) et dans les coléoptiles d'avoine (Li *et al.,* 1993). Selon Sampedro et Cosgrove (2005), les expansines appartiennent à une superfamille composée de quatre familles : (1) une EXPANSINE A (EXPA), également appelée α-expansine; (2) une EXPANSINE B (EXPB), également connue en tant que β-expansine; (3) une EXPANSINE-LIKE A (EXLA); et (4) une EXPANSINE-LIKE B (EXLB).

Les α- et β-expansines sont impliquées dans l'expansion des cellules : les EXPAs peuvent favoriser la séparation de microfibrilles de cellulose en induisant la dissociation locale et le glissement des XyGs sur la surface de la cellulose, tandis que les EXPBs fonctionnent sur différents polymères, avec un effet semblable (McQueen-Mason et Cosgrove, 1994). Le rôle précis des EXLAs et des EXLBs n'a pas encore été établi (McQueen-Mason et Cosgrove, 1994) et à ce jour, aucune activité enzymatique n'a été détectée pour ces protéines (McQueen-Mason et Cosgrove, 1995; Sharova, 2007).

Le génome d'*A. thaliana* contient 36 gènes codant pour des EXPs putatives (Sharova, 2007; Mollet *et al.,* 2013). L'analyse du profil d'expression des transcrits révèle qu'une α- (*EXPA4*) et une β-expansine (*EXPB5*) sont fortement exprimées dans les grains de pollen secs, au cours de l'imbibition du pollen et de la croissance du tube pollinique (Figure 20) (Mollet *et al.,* 2013). En outre, quatre autres *EXPs* sont fortement exprimées dans le stigmate et une autre dans l'ovaire de *A. thaliana* (Mollet *et al.,* 2013).

Même si la fonction exacte des EXPs de pollen reste sans réponse, Cosgrove et collaborateurs (1997) ont suggéré que ces EXPBs seraient libérées des grains de pollen sur le pistil pour ramollir la paroi des cellules de stigmate facilitant ainsi la pénétration et la croissance du tube pollinique. D'autres ont émis l'hypothèse que les EXPBs seraient impliquées dans la formation de la paroi de l'exine lors de la formation de gamétophyte mâle (Jin *et al.,* 2006).

Endo-xyloglucane hydrolase Transglucosylase :

Les deux activités connues des protéines XyG endo-transglucosylase hydrolase (XTH) sont les activités XyG endo-transglucosylase (XET) et XyG endo-hydrolase (XEH) (Rose *et al.,* 2002). L'activité XET est de cliver les polymères XyG et de joindre l'extrémité nouvellement générée à une autre chaîne XyG, alors que l'activité XEH hydrolyse des polymères de XyG (Rose *et al.,* 2002). Les XTHs sont censées jouer un rôle central dans la construction et le démontage de l'architecture de la paroi cellulaire (Rose *et al.,* 2002). Celles-ci sont codées par une grande famille de gènes chez les plantes terrestres. Ainsi *A. thaliana* et le riz contiennent 33 et 29 gènes *XTH*s, respectivement (Yokoyama et Nishitani, 2001 ; Yokoyama *et al.,* 2004).

Parmi les 33 *XTH*s prédites dans le génome *A. thaliana*, 4 sont fortement exprimées dans les fleurs (Becnel *et al.,* 2006). Les activités *pXTH29::GUS* et

pXTH30::GUS sont clairement détectées lors de l'élaboration des anthères et dans le grain de pollen mature (Becnel *et al.,* 2006). En revanche, les activités *pXTH1::GUS* et *pXTH33::GUS* sont limitées aux très jeunes fleurs.

De plus, les profils d'expression de *XTH29* et *XTH30* semblent être spécifiques du pollen, ce qui suggère une fonction spécialisée pendant le développement du pollen (Figure 20). Cependant, à ce jour, aucune évidence expérimentale n'a montré un rôle des XTHs dans la croissance du tube pollinique. Une seule XTH a été liée à la pollinisation. La perte de fonction d'*AtXTH28* a conduit à une diminution spectaculaire de la production de graines en raison d'une réduction importante de la longueur des filets des étamines (Kurasawa *et al.,* 2009) provoquant une impossibilité à la plante mutante de s'auto-polliniser.

3. f. 2. Les pectines lyases :

Les gènes codant pour les PLs (pectine lyases) et les PLLs (pectine lyases-like) sont également abondamment exprimés dans la tomate, le tabac, la luzerne et le pollen d'*A. thaliana* (Wing *et al.,* 1989 ; Kulikauskas et McCormick, 1997) et plusieurs allergènes de pollen ont des activités PLLs (Marin-Rodriguez *et al.,* 2002).

Sur les 26 gènes codant pour des PLLs, 14 sont exprimés dans le pollen (Palusa *et al.,* 2007). Aucun de ces 14 gènes n'est cependant spécifiquement dédié au gamétophyte mâle, mais 4 d'entre eux sont fortement exprimés dans les grains de pollen (Figure 20) (Mollet *et al.,* 2013). De nombreuses activités promotrices des gènes de PLLs sont similaires à celles présentées par des PGases (Sun et Van Nocker, 2010). Ceci pourrait impliquer une association fonctionnelle étroite entre les PLLs et les PGases, en particulier dans la digestion de la paroi cellulaire des grains de pollen, avant la germination, et pendant la croissance du tube pollinique (Figure 20) (Dai *et al.,* 2007 ; Sun et Van Nocker, 2010 ; Jiang *et al.,* 2014).

3. f. 3. Les glycosides hydrolases :

Les GHs sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des liaisons glycosidiques entre deux ou plusieurs glycosides ou entre un hydrate de carbone et une fraction non

glucidique. Celles impliquées dans le remodelage de la paroi cellulaire du tube pollinique appartiennent aux GH3, 9, 10, 17, 28, 35, 43 et 51 (Mollet *et al.,* 2013).

Les endo-(1-4)-β-glucanases et les endo-(1-3)-β-glucosidases sont membres de la famille GH17 et GH9, respectivement (Mollet *et al.,* 2013). Chez *A. thaliana*, 25 gènes codent pour des GH9 et 49 pour des GH17.

Parmi les 25 *CELLULASES* putatifs, deux sont fortement exprimés dans les grains de pollen et trois dans les tubes polliniques cultivés *in-vitro* (Mollet *et al.,* 2013). Récemment, il a été montré que la cellulose, malgré sa faible abondance dans la paroi cellulaire du tube pollinique, jouerait un rôle essentiel en agissant sur le diamètre des tubes polliniques cultivés *in-vitro* (Aouar *et al.,* 2010). Comme décrit précédemment, la paroi cellulaire des tubes polliniques à croissance rapide est enrichie en callose (Figure 20) et plusieurs études ont montré que des traitements modérés avec des β-(1-3)-glucanases sont capables de stimuler la germination des grains de pollen (Roggen et Stanley, 1969 ; Parre et Geitmann, 2005a, 2005b).

En outre, il a été signalé que des exo-β-glucanases pourraient jouer un rôle important dans la régulation de l'allongement du tube pollinique chez le lys (Takeda *et al.,* 2004). A l'inverse, des traitements avec des inhibiteurs de glucosidases inhibent sévèrement la croissance des tubes polliniques (Kotake *et al.,* 2000). Il a été émis l'hypothèse que les propriétés mécaniques de la callose et plus précisément la résistance à la déformation latérale du tube, seraient régulées par les glucanases (Parre et Geitmann, 2005a).

Les PGases sont impliquées dans la dégradation des HGs. Elles ont été caractérisées dans le pollen de maïs (Pressey et Reger, 1969) et ont depuis été identifiées chez d'autres plantes dont le riz, le pois, la tomate et *A. thaliana* (Dai *et al.,* 2006 ; Sun et Van Nocker, 2010 ; Hadfield et Bennett, 1998 ; AGI, 2000). Les PGases appartiennent à la famille GH28, composée de 69 gènes chez *A. thaliana* (González-Carranza *et al.,* 2007 ; Kim et al., 2006). Six gènes codant pour des PGases sont fortement exprimés dans les tubes polliniques et un est exprimé dans le pistil (Figure 20) (Mollet *et al.,* 2013) suggérant un remodelage important des pectines, notamment des HGs au cours de la croissance du tube pollinique. Les PGases sont impliquées, au cours de la maturation du pollen de *Brassica campestris*, dans la formation de l'intine et/ou de l'exine (Huang *et al.,* 2009a, 2009b) et chez *Turnera subulata*, les PGases ont été

impliquées dans l'auto-incompatibilité (Tamari et Shore, 2006). Des PGases sont libérées lors de la réhydratation des grains de pollen chez *Triticum* (Zaidi *et al.,* 2012) et sont également détectées à l'extrémité des tubes polliniques chez *Brassica napus* lors de la pénétration du tube pollinique dans les papilles du stigmate (Dearnaley et Daggard, 2001) suggérant que certaines PGases sont plutôt impliquées dans le relâchement de la paroi cellulaire des tissus femelles.

Les β-galactosidases (βGALs) appartiennent à la famille GH35. Les βGALs peuvent agir sur différents substrats dont les AGPs, des galactolipides, le RG-I, le RG-II et le XyG (Dey et Del Campillo, 1984). Dix-huit gènes codent pour des *βGALs* dans le génome d'*A. thaliana* et l'analyse transcriptomique révèle que les niveaux d'expression des βGALs sont élevés dans les feuilles matures, les racines, les fleurs et les siliques, mais sont faibles dans les jeunes plantes (Ahn *et al.,* 2007). Deux *βGALs* sont fortement exprimées dans les grains de pollen matures et 2 autres sont fortement exprimées dans le pistil (Figure 20).

Chez le riz, 35 gènes codent pour des *βGALs* ; parmi elles, deux sont fortement exprimées dans les grains de pollen secs (Tanthanuch *et al.,* 2008). Comme les mutants défectueux en βGALs présentent des altérations de la fertilité, il a été émis l'hypothèse que celles-ci pourraient être impliquées dans le turnover de la paroi du tube pollinique chez *Brassica campestris* en hydrolysant des arabinogalactanes (Singh et Knox, 1985). En 1995, il avait été aussi suggéré chez le tabac que les βGALs pourraient être sécrétées par les tubes polliniques et une fois dans le tissu de transmission du style modifieraient les chaînes latérales des AGPs. Cette modification de la glycosylation des AGPs du style permettrait le guidage des tubes polliniques (Cheung *et al.,* 1995 ; Wu *et al.,* 1995). Enfin, il a également été suggéré que les βGALs pourraient être requises pour l'activité des PMEs (Western *et al.,* 2001 ; Walker *et al.,* 2011).

Les données de transcriptomique ont montré un très fort profil d'expression, spécifique du pollen, d'un gène codant pour une β-xylosidase dans les grains de pollen matures secs (Hruba *et al.,* 2005) et dans les tubes polliniques cultivés *in-vitro* et semi-*in-vivo*. Le substrat exact de cette enzyme n'est pas connu, mais il pourrait dégrader plusieurs polymères de la paroi cellulaire tels que les xylanes, les XyGs et éventuellement des N-glycoprotéines. Toutes les autres xylosidases putatives (12 gènes qui appartiennent aux familles GH3 et GH31) ne sont pas exprimées dans le pollen

(Figure 20). Cependant, deux gènes codant des α-xylosidases sont exprimés dans le pistil (Mollet *et al.,* 2013).

L'analyse du mutant *Atxyl1* chez *A. thaliana* a montré une réduction de l'activité α-xylosidase, une modification de la composition en XyG et des siliques plus courtes par rapport au type sauvage. En outre, l'expression du promoteur couplé à une activité GUS *pAtxyl1::GUS* est forte dans le style (Sampedro *et al.,* 2010). Ces résultats indiquent qu'*At*XYL1 pourrait remodeler les XyGs. Cependant, il est difficile d'impliquer directement cette activité α-xylosidase à la croissance du tube pollinique car la production de graines n'est apparemment pas affectée.

Finalement, les données de transcriptomique ne montrent pas de forte expression des gènes codant pour des arabinofuranosidases dans le pollen (Mollet *et al.,* 2013). Ceci est surprenant étant donné que l'arabinose est l'un des principaux monosaccharides présents dans la paroi cellulaire des tubes polliniques d'*A. thaliana* (Dardelle *et al.,* 2010). Néanmoins, 3 gènes sont fortement exprimés dans les tissus femelles (Mollet *et al.,* 2013) suggérant que si les arabinanes des tubes polliniques sont modifiés, ils le seraient par des enzymes émanant du pistil.

Pour finir, une pectine acétyl-estérase putative a été détectée dans le pollen de riz (Dai *et al.,* 2006) et une étude récente a montré que la surexpression de la PECTINE-ACETYLESTERASE1 du peuplier chez le tabac affecte la forme des grains de pollen et leur capacité à germer (Gou *et al.,* 2012).

I. 4. LES PECTINES MÉTHYLESTÉRASES : PMEs

Les PMEs représentent une large famille multigénique de pectinases (Micheli *et al*., 1998 ; Sénéchal *et al.,* 2014) et appartiennent à la famille CAZy des carbohydrates estérases de la famille 8 (CE8 ; E.C.3.1.1.11 ; http://www.cazy.org). Chez le riz, 127 gènes putatifs coderaient pour des PMEs, d'après la base de données RGAP (Rice Genome Annotation Project, http://rice.plantbiology.msu.edu/), et 66 chez *A. thaliana* (AGI, 2000).

I. 4. a. Structure des PMEs :

Des alignements de séquences en acides aminés révèlent que de nombreuses PMEs issues d'organismes divers comme les plantes, les champignons ou les bactéries présentent des régions conservées (Figure 21). En effet, trois acides aminés du domaine catalytique (Asp157, Arg225 et Trp 227; Figure 21, en bleu) ; deux à trois glycines (Figure 21, en noir) ainsi que d'autres (Figure 21, Cys en rose, His en turquoise et Phe/Tyr en jaune) sont fortement conservés (Johansson *et al.,* 2002 ; Pelloux *et al.,* 2007).

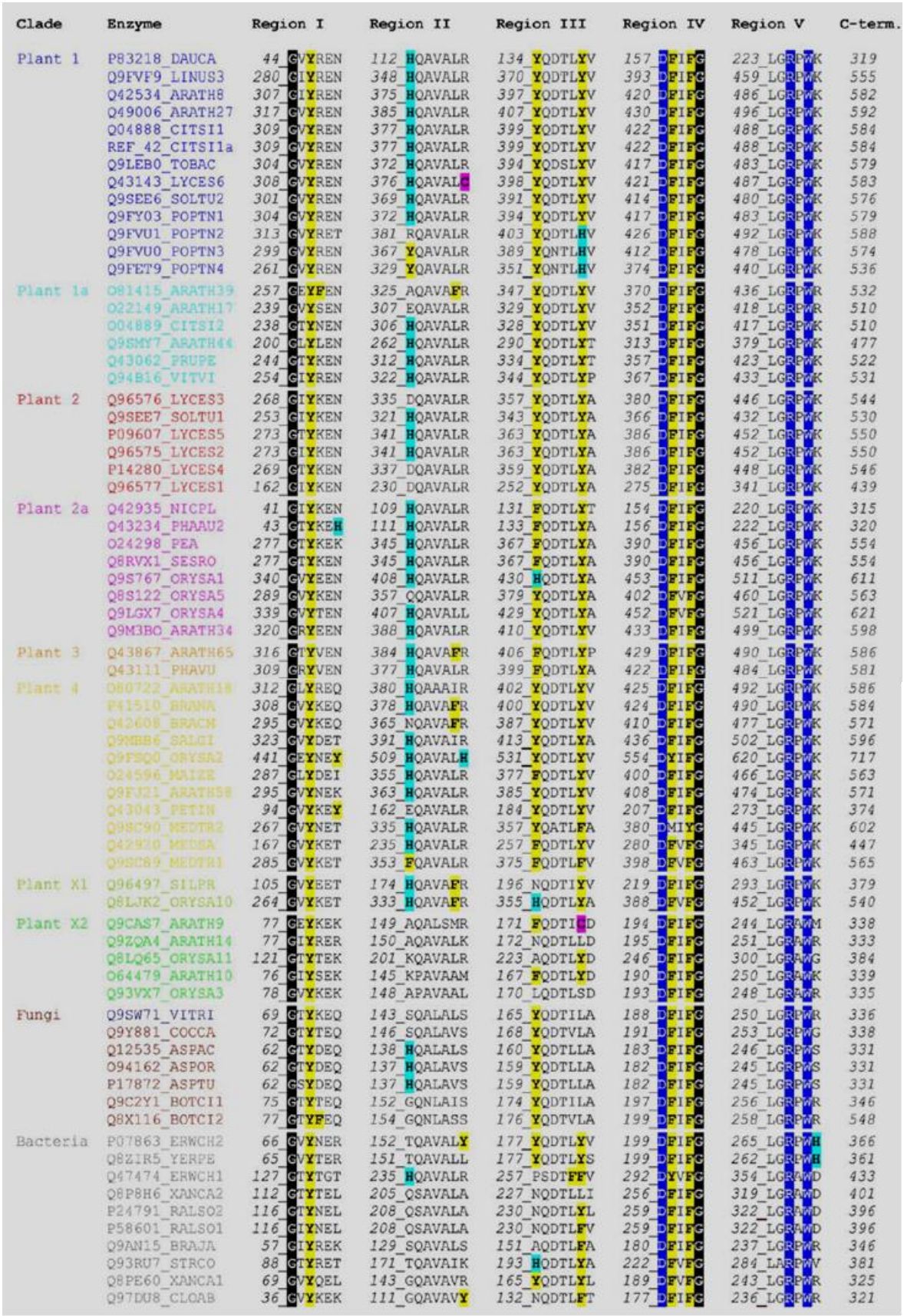


Figure 21 : Alignements des séquences d'acides aminés provenant des segments conservés de 70 PMEs issues de plantes, champignons et bactéries et montrant les acides aminés conservés (D'après Markovič et Janeček, 2004).

De même les structures tridimensionnelles, élucidées par cristallographie de 3 PMEs de *Dickeya dadantii (D. dadantii*, anciennement *Erwinia chrysanthemi)*, de la tomate et de la carotte, révèlent une structure assez proche (Figure 22) notamment *via* les 3 feuillets bêta (PB1, PB2 et PB3 en jaune) reliés par des boucles (T1, T2 et T3 en rouge).

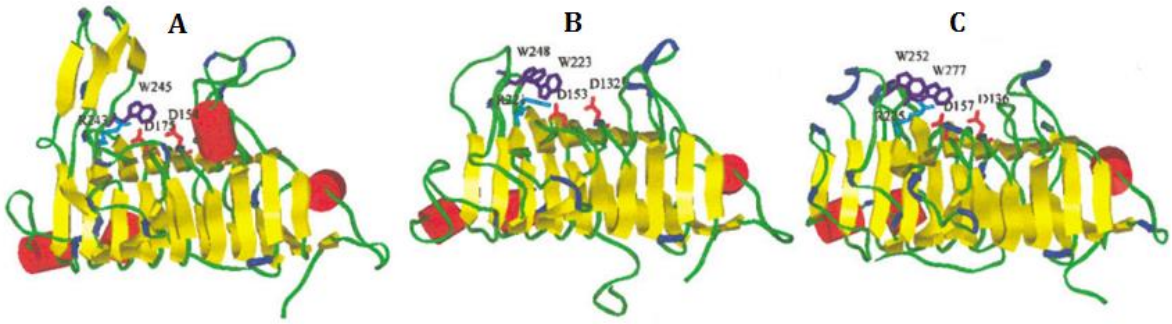


Figure 22 : Structures tridimensionnelles de différentes PMEs obtenues par cristallographie. A : PME de *D. dadantii* ; B : PME de tomate ; C : PME de carotte (D'après D'avino *et al.,* 2003).

Le site de fixation des HGs méthyl-estérifiés est formé par une faille dont la partie centrale est composée notamment de résidus aromatiques (Tyr, Phe, Trp) caractéristiques des sites de fixation des polysaccharides (Jolie *et al.,* 2010). Les résidus participant à la formation du site catalytique (Asp154, Asp175, et Arg243 chez la PME de *D. dadantii*, Asp132, Asp153, et Arg221 chez la PME de tomate, et Asp136, Asp157, et Arg225 chez la PME de carotte) ainsi que les résidus Trp présents au niveau du site actif clivé (Trp245 chez la PME de *D. dadantii*, Trp223 et 248 chez la PME de tomate, et Trp227 et 252 chez la PME de carotte) sont présents. Finalement, les trois acides aminés impliqués dans le site actif et les résidus Gln109 et Gln131 permettraient la stabilisation des intermédiaires catalytiques (Di Matteo *et al.,* 2005).

I. 4. b. Les modes d'actions des PMEs :

Les PMEs sont des enzymes capables d'enlever les groupements méthylesters des HGs. Ces derniers sont synthétisés dans l'appareil de Golgi sous forme hautement méthyl-estérifiés (70 à 80 %) puis sont sécrétés dans la paroi (Willats *et al.,* 2001 ; Wolf et *al.,* 2009a et 2009b) où les PMEs agissent. Elles dé-méthylestérifient les HGs par conversion du groupement méthoxyl de la chaîne d'acide galacturonique (GalA) en groupement carboxyle chargé négativement libérant à la fois du méthanol et des protons (Figure 23) (Wolf *et al.,* 2009a et 2009b ; Jolie *et al.,* 2010).

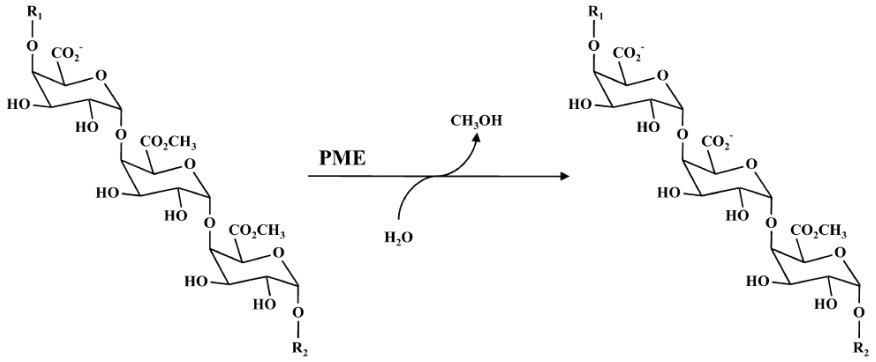


Figure 23 : Réaction de dé-méthylestérification des chaînes des HGs méthyl-estérifiés catalysée par les PMEs (D'après Jolie *et al.,* 2010).

A ce jour, 2 modes d'actions des PMEs ont été proposés. Le premier correspond au mode processif, tandis que le second correspond au mode aléatoire.

Le mode d'action des PMEs pourrait être régulé par le degré initial de méthyl-estérification des HGs et le pH. En effet, les PMEs à action aléatoire sont fonctionnelles à pH acide et dé-méthyl-estérifient aléatoirement les chaînes d'HGs en fonction de leur degré initial de méthyl-estérification (DM, Figure 24 a). Ces polymères seraient alors la cible de PGases ou PLLs pariétales conduisant à un clivage des chaînes d'HGs qui affecterait ainsi la rigidité de la paroi cellulaire (Micheli *et al.,* 2001 ; Cameron *et al.,* 2008).

Les PMEs à action processive (Figure 24 b) sont fonctionnelles à pH basique. Lorsque les HGs sont dé-méthyl-estérifiés, ils peuvent alors interagir avec les ions calcium (Ca^{2+}) et ainsi renforcer la structure de la paroi en formant un complexe dit « boîte à œufs». D'autre part, les protons produits lors de l'hydrolyse diminuent localement le pH de la paroi et cette acidification pourrait permettre l'activation des hydrolases pariétales qui jouent un rôle dans l'extension et la croissance cellulaire.

Cette action séquentielle des PMEs et des PGases a été démontrée chez les mutants *quartet* qui libèrent le pollen sous forme de tétrade dû à la persistance des polysaccharides pectiques (Rhee et Somerville, 1998). En effet, l'action successive de QUARTET1, une PME, et de QUARTET3, une PGase, permet la dégradation des HGs de la tétrade entraînant une séparation normale des grains de pollen durant la microsporogénèse (Rhee *et al.,* 2003 ; Francis *et al.,* 2006).

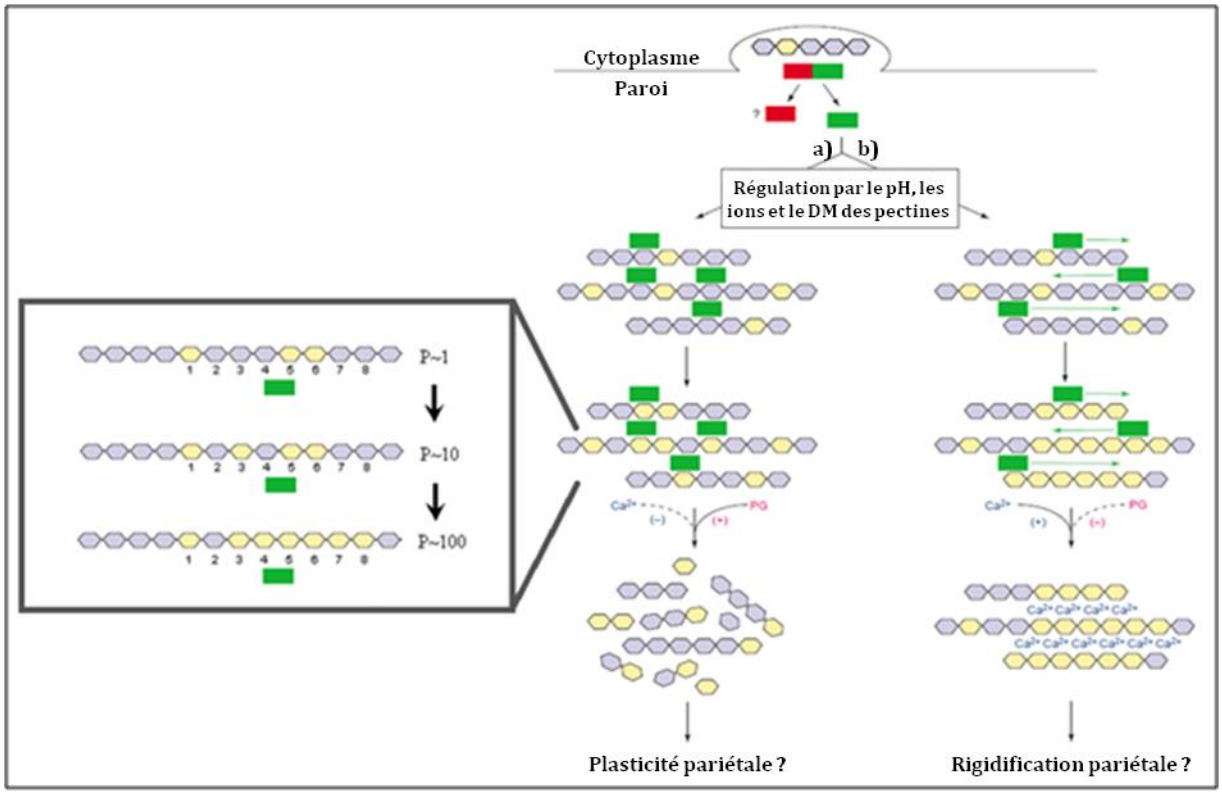


Figure 24 : Modes d'action des PMEs.
a) mode aléatoire, b) mode processif. L'encadré représente la variabilité du mode aléatoire de la PME de citron selon les DMs (représentés par les valeurs P~1 : faiblement méthyl-estérifiés à P~100 : fortement méthyl-estérifiés) des HGs (Adapté de Micheli *et al.,* 2001 et Cameron *et al.,* 2008).

I. 4. c. Les différents groupes de PME :

En accord avec la structure primaire et la présence de l'extension N-terminale (N-term) (PRO-région), les PMEs peuvent être classées en deux groupes (Figure 25). Sur les 66 PMEs putatives d'*A. thaliana*, 23 sont prédites comme appartenant au groupe I et 43 au groupe II.

Les *PMEs* du groupe I (type 2) sont caractérisées par un peptide signal (SP signal peptide) permettant l'adressage au Golgi de cette protéine, un domaine transmembranaire (TM) et un domaine PME composé de cinq à six introns (Figure 25). Les PMEs du groupe II (type 1) sont caractérisées par la présence, en supplément des régions SP et TM, d'une PRO-région en N-term (Figure 25). La PRO-région en N-term des PMEs du groupe II présente une homologie significative avec les PMEIs (inhibiteurs de PME) et pourrait contenir de 1 à 3 domaines PMEI et dans la partie en C-term, un domaine PME dont les séquences nucléotidiques sont composées de seulement deux à trois introns (Pelloux *et al.,* 2007). La PRO-région est clivée lors de la maturation des

PMEs au niveau du PM (processing motif), libérant ainsi le domaine PMEI (d'une taille comprise entre 17 et 70 kDa, et de pI entre 4,6 et 10,1) du domaine PME (d'une taille allant de 32 à 53,3 kDa, pI entre 4,3 et 10,6).

Cette PRO-région pourrait donc jouer un rôle d'inhibiteur intramoléculaire de l'activité PME afin d'éviter une dé-méthyl-estérification prématurée des HGs méthyl-estérifiés en cours de sécrétion dans les vésicules golgiennes (Figure 26) (Micheli, 2001 ; Pelloux *et al.,* 2007 ; Wolf *et al.,* 2009a et 2009b).

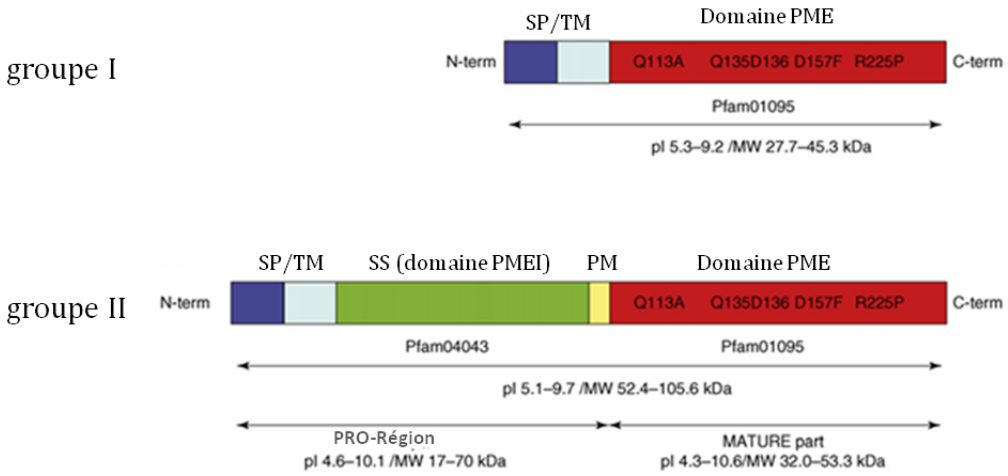


Figure 25 : Les différents groupes de PMEs et leurs structures tridimensionnelles (D'après Pelloux *et al.,* 2007).
SP, peptide signal (adressage au Golgi) ; TM, domaine transmembranaire ; SS : PRO-Région (inhibiteur de PME ou inhibiteur d'invertase, ayant 1 à 3 domaines) ; PM, zone de clivage par les subtilases (Processing Motif).

La maturation est nécessaire pour que les PMEs soient actives dans la paroi cellulaire où elles sont sécrétées. En effet, dans la majorité des cas, comme pour *At*PME3, seules les séquences peptidiques spécifiques des parties matures des PMEs sont retrouvées dans le protéome pariétal (Guénin *et al.,* 2011). Cette maturation pourrait être réalisée par des subtilases (SBTs) qui peuvent cliver la partie PRO au niveau du domaine PM (*Processing Motif*) (Figure 25), qui présente deux motifs basiques très conservés (Wolf *et al.,* 2009b). Les SBTs sont des protéases de type sérine de la famille S8 (Pfam00082), qui se distinguent des autres protéases par leur arrangement spécifique de résidus Asp, His et Ser en triade au niveau du site catalytique (Tripathi et Sowdhamini, 2006 ; Ottmann *et al.,* 2009 ; Rose *et al.,* 2010). Elles sont présentes dans l'ensemble du règne végétal où elles forment des familles de taille plus ou moins grande

: 23 gènes chez la mousse *Physcomitrella patens*, 56 gènes chez *A. thaliana*, 63 gènes chez le riz et 90 gènes chez le peuplier (Beers *et al.,* 2004 ; Rautengarten *et al.,* 2005 ; Tripathi et Sowdhamini 2006 ; Ottmann *et al.,* 2009 ; Schaller *et al.,* 2012). Cela suggère que ce type de protéases doit jouer un rôle important dans des processus conservés chez les végétaux.

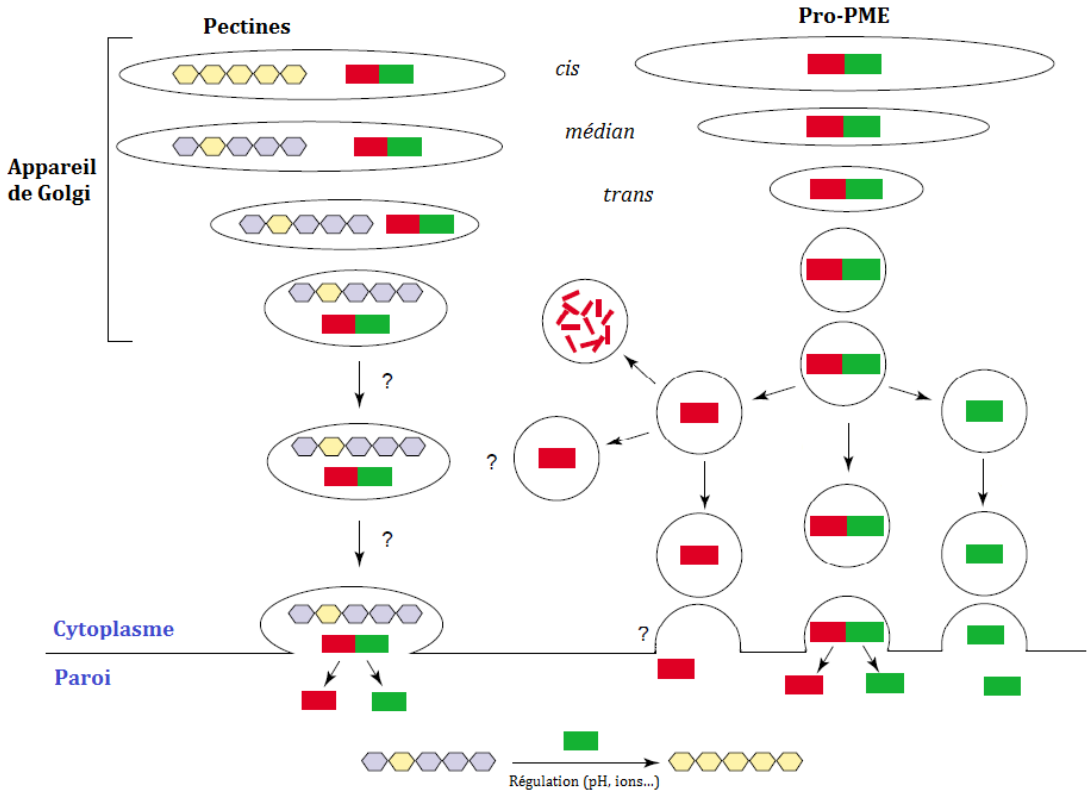


Figure 26 : Schéma représentant la co-sécrétion hypothétique des PMEs du groupe II et des HGs de l'appareil de Golgi et des vésicules golgiennes jusqu'à la paroi.
Rectangle rouge PMEI, rectangle vert PME (D'après Micheli *et al.,* 2001, modifié par Wolf *et al.,* 2009b).

Chez *A. thaliana*, l'alignement des séquences protéiques des 56 SBTs et l'étude des similarités de séquences ont permis de révéler l'existence de six sous-familles (AtSBT1-6, Rautengarten *et al.,* 2005). De plus, parmi ces 56 SBTs d'*A. thaliana*, 46 isoformes possèdent un peptide signal putatif d'adressage vers les voies de sécrétion (Rautengarten *et al.,* 2005). 82 % des SBTs, potentiellement localisées à un moment donné dans l'appareil de Golgi, pourraient agir localement sur des précurseurs protéiques qui nécessitent une maturation afin d'être activées et sécrétées (Liu *et al.,* 2007 ; Liu *et al.,* 2008 ; Liu et Howell, 2010a ; 2010b). Les SBTs pourraient également être excrétées vers le compartiment extracellulaire où elles agiraient sur les protéines

pariétales. Des données expérimentales confirment en effet la localisation pariétale de quatre SBTs : *At*SBT1.1, *At*SBT1.2 (SDD1), *At*SBT1.7 (ARA12 ou SLP1) et *At*SBT3.3 (Von Groll *et al.,* 2002 ; Hamilton *et al.,* 2003 ; Srivastava *et al.,* 2008 ; Ramírez *et al.,* 2013). Le nombre élevé de SBTs sécrétées vers la paroi suggère un rôle dans la dégradation non spécifique de protéines structurales (Antão et Malcata, 2005 ; Rautengarten *et al.,* 2008 ; D'Erfurth *et al.,* 2012) et le clivage spécifique de domaines inhibiteurs d'enzymes de modifications de la paroi. Une étude a examiné le rôle d'une SBT sur une isoforme de PME (Sénéchal *et al.,* 2014). Il a été montré que *At*PME17 serait co-exprimée, à la fois spatialement et temporellement, avec *At*SBT3.5 au cours du développement des racines (Sénéchal *et al.,* 2014), indiquant une possible interaction des deux protéines.

I. 4. d. La régulation des PMEs par les PMEIs :

4. d. 1. Les PMEIs :

Les PMEIs ne sont pas seulement trouvés dans la PRO-région des PMEs mais existent aussi en protéines libres. Ces PMEIs pourraient donc inhiber aussi la dé-méthyl-estérification des HGs par les PMEs du groupe I qui ne possèdent pas la PRO-région. Ainsi, les PMEIs seraient capables de se fixer aux PMEs et inhiberaient ainsi leur activité de manière réversible. S'il est clair que le pH influence la formation et la stabilité du complexe PME-PMEI, il est aussi évident que cet effet est plus ou moins marqué en fonction du couple PME-PMEI considéré. Chez *A. thaliana*, les *PME*s et *PMEI*s constituent des familles multigéniques de 66 et 76 membres putatifs, et des combinaisons spécifiques PME-PMEI pourraient donc exister selon les tissus et stades de développement considérés. Plusieurs analyses transcriptomiques montrent que des gènes codant des PMEs et des PMEIs sont co-exprimés au cours du développement chez *A. thaliana* (Ko *et al.,* 2004 ; Pina *et al.,* 2005 ; Zhao *et al.,* 2005 ; Peaucelle *et al.,* 2008 ; Minic *et al.,* 2009; Wolf *et al.,* 2009a ; Pelletier *et al.,* 2010). Une analyse non-exhaustive de l'expression des gènes codant des PMEs et PMEIs au cours du développement, à partir des données publiques de transcriptomique, a permis de mettre en évidence cinq clusters d'expression distincts, dont chacun regroupe plusieurs gènes *PME*s et *PMEI*s (Wolf *et al.,* 2009a).

Le premier PMEI découvert et caractérisé a été isolé dans les fruits de kiwi (*Actinidia deliciosa*) (Balestrieri *et al.,* 1990 ; Giovane *et al.,* 1994, 2004). Ce PMEI de kiwi

est capable d'inhiber l'activité des PMEs d'*A. thaliana*, *in-vitro* et *in-vivo* (Balestrieri *et al.,* 1990). Ce n'est que plus tardivement que les PMEIs d'*A. thaliana* ont été caractérisés (Wolf *et al.,* 2003 ; Raiola *et al.,* 2004). Lorsque l'on compare la structure tridimensionnelle du PMEI de Kiwi avec le PMEI1 d'*A. thaliana*, on observe que celle-ci est constituée de 4 hélices α formant un faisceau central, et est également constituée d'hélices α en N-terminal (Figure 27).

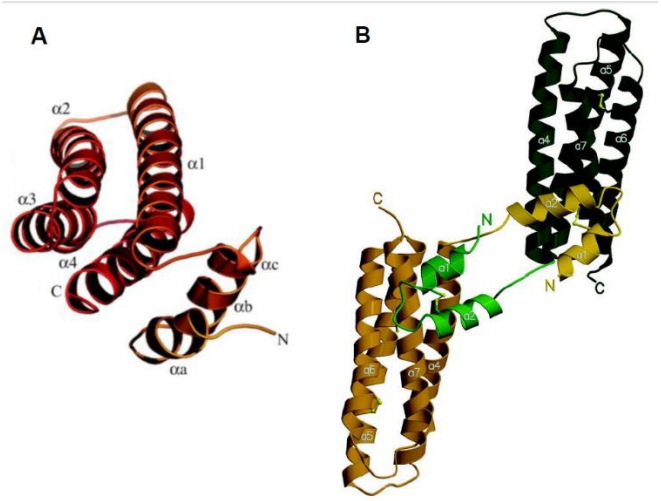


Figure 27 : Structures tridimensionnelles des PMEIs de kiwi et d'*A. thaliana.*
(A) Structure tridimensionnelle de l'*Ac*PMEI. Les hélices α formant le faisceau de quatre hélices α sont annotées α1, α2, α3 et α4 alors que les hélices α constituant la région N-term sont appelées αa, αb et αc (Di Matteo *et al.,* 2005). (B) Structure tridimensionnelle de l'*At*PMEI1 cristallisée sous forme dimérique. Les hélices α constituant la partie N-term sont annotées α1 et α2, tandis que celles formant le faisceau de quatre hélices α sont appelées α4, α5, α6 et α7 *(*D'après Hothorn *et al.,* 2004b).

Ces PMEIs sont capables de former un complexe stable avec les PMEs (Figure 28), permettant ainsi l'inhibition des PMEs *in-vitro* et *in-vivo* (Wolf *et al.,* 2003 ; Raiola *et al.,* 2004 ; Lionetti *et al.,* 2007). Lors de l'interaction entre la PME de tomate et le PMEI de kiwi, cinquante acides aminés (23 sur la PME et 27 sur le PMEI) permettent d'établir le contact entre les deux protéines (Figure 28). Vingt deux acides aminés sont liés par des liaisons hydrogènes et quatre forment des ponts salins (Di Matteo *et al.,* 2005). Les résidus impliqués dans le site catalytique et dans la stabilisation des intermédiaires catalytiques n'interagissent pas avec le PMEI alors que trois acides aminés aromatiques (Phe80, Tyr135 et Trp223), impliqués dans la liaison de la PME à son substrat, établissent un contact avec le PMEI, notamment au niveau de cinq acides aminés conservés (Thr73, Glu76, Asn77, Thr113 et Asp116). Ce dernier, en interagissant avec la PME, recouvre le sillon peu profond de l'enzyme où se trouve le site actif. Plus

précisément, les hélices α2, α3 et α4 du PMEI se lient avec l'enzyme à proximité du site actif (Figure 28). De cette façon, le PMEI empêche la PME de se lier à son substrat.

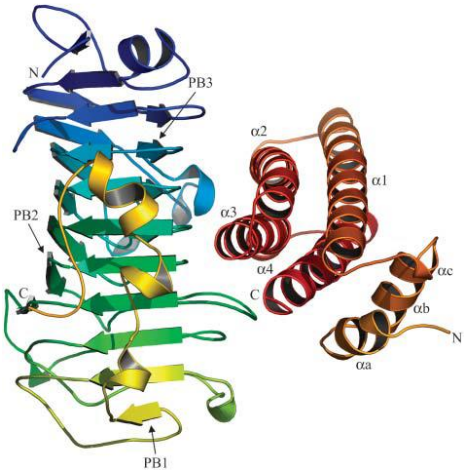


Figure 28 : Structure du complexe PME de tomate (bleu-vert) -PMEI de kiwi (D'après Di Matteo *et al.,* 2005).
PB : feuillets-β pouvant être impliqués dans le complexe PME-PMEI. αa, αb, et αc sont les hélices-α de la région N-term, tandis que les 4 autres hélices-α de la PME sont numérotées de 1 à 4.

En fonction du PMEI et du modèle de développement considéré, les rôles des PMEIs semblent relativement complexes. L'implication des PMEIs dans le contrôle de la forme ainsi que dans la plasticité cellulaire lors de l'élongation a été étudiée *via* le méristème caulinaire apical. En effet, plusieurs études ont montré que la modification des pectines était un élément crucial dans la formation des organes. Plus précisément, le DM des HGs joue un rôle essentiel dans la formation des primordiaux floraux au niveau du méristème apical caulinaire (Peaucelle *et al.,* 2008 ; Peaucelle *et al.,* 2011 ; Braybrook et Peaucelle, 2013).

La surexpression chez *A. thaliana* des gènes *AtPMEI1* et *AtPMEI2* conduit à une diminution de l'activité PME et une augmentation du DM des HGs, stimulant l'allongement des cellules racinaires dans la zone d'élongation (Lionetti *et al.,* 2007). La surexpression du gène *AtPMEI3* chez *A. thaliana* conduit à l'inhibition de la formation des primordiaux, résultant d'une diminution de la dé-méthyl-estérification des HGs et d'une modification des propriétés physiques des parois (Peaucelle *et al.,* 2008). De même, la surexpression de l'*AtPMEI4* provoque un retard de croissance de l'hypocotyle étiolé, associé à des modifications du DM des HGs (Pelletier *et al.,* 2010). Les mêmes conséquences phénotypiques (diminution de la croissance de l'hypocotyle à l'obscurité et de la racine principale) sont observées lorsque le gène *AtPMEI5* est surexprimé chez *A. thaliana* (Wolf *et al.,* 2012b). Les dernières études publiées montrent un rôle

particulier d'*AtPMEI5* et d'*AtPMEI6* dans la germination et la libération du mucilage chez *A. thaliana*. Lorsqu'*AtPMEI5* est surexprimé, il inhibe l'activité PME et augmente le contenu en méthyl-ester dans la paroi (Müller *et al.,* 2013). L'activité PME jouerait ainsi un rôle dans la régulation de l'émergence de la radicule en modifiant localement les propriétés mécaniques de la paroi entre la poussée de la radicule et les forces de résistance de l'endosperme. *At*PMEI6 serait quant à lui impliqué dans l'excrétion du mucilage. En effet, le mutant *pmei6-1* présente une augmentation d'activité PME totale, entraînant des modifications de la structure de la paroi qui affecte la libération du mucilage. Ceci est confirmé avec la complémentation du mutant *pmei6-1* qui présente une libération du mucilage semblable à celle du sauvage (Saez-Aguayo *et al.,* 2013). PMEI6 jouerait ainsi un rôle dans le contrôle du DM des pectines des parois des cellules à mucilage, ayant des conséquences sur la rupture de la paroi et la libération du mucilage.

4. d. 2. Les PMEIs / Inhibiteurs d'invertases :

Tout comme le domaine PRO des PMEs du groupe II, les PMEIs présentent aussi les mêmes similarités de séquences avec les inhibiteurs d'invertases, protéines localisées dans l'apoplasme et la vacuole. Les protéines sont de tailles similaires à celles des PMEIs mais inhibent spécifiquement les invertases qui interviennent dans le métabolisme du saccharose chez les plantes supérieures (Hothorn *et al.,* 2004a ; Rausch et Greiner, 2004 ; Link *et al.,* 2004 ; Hothorn *et al.,* 2010). Si le pourcentage de similarité entre les PMEIs et les inhibiteurs d'invertases est relativement peu élevé (25 à 30 %), les quatre résidus Cys nécessaires à la formation des ponts disulfures sont hautement conservés (Scognamiglio *et al.,* 2003 ; Giovane *et al.,* 2004). Le cinquième résidu Cys porteur du groupement thiol libre, présent chez la majorité des PMEIs (Woriedh *et al.,* 2013), est en revanche absent de toutes les séquences des Inhibiteurs d'invertases identifiées jusqu'alors (Scognamiglio *et al.,* 2003). Ce cinquième résidu Cys pourrait de ce fait être un élément déterminant dans l'interaction spécifique PME-PMEI.

La cristallisation de l'*Ac*PMEI (Di Matteo *et al.,* 2005), d'un PMEI d'*A. thaliana* *At*PMEI1 (Hothorn *et al.,* 2004b) et d'un Inhibiteur d'invertases (CIF) de tabac *Nt*-CIF (Hothorn *et al.,* 2003; Hothorn *et al.,* 2004a) a permis de mieux appréhender les spécificités et différences de structures, existant entre les PMEIs et les inhibiteurs d'invertases (Hothorn *et al.,* 2004b). L'*Ac*PMEI est composé majoritairement d'hélice α.

L'inhibition de l'activité PME se produit grâce à la formation d'un complexe inactif et stœchiométrique 1:1 entre la PME et le PMEI (Giovane *et al.,* 2004 ; Jolie *et al.,* 2010).

La cristallisation et la résolution de la structure tridimensionnelle du *Nt*-CIF ont permis de mettre en évidence un état monomérique de cet inhibiteur. Il présente le même type de structure tridimensionnelle que l'*At*PMEI1, avec une structure très conservée au niveau du domaine central et des différences dans la région N-term (Hothorn *et al.,* 2004b). L'affinité PME-PMEI et invertases-CIF serait liée à des différences observées dans l'extension N-term (Hothorn *et al.,* 2004b). Une version tronquée de l'*At*PMEI1, ne présentant plus l'extension N-term, inhibe l'activité PME seulement pour des doses très élevées, comparé au PMEI natif. Par ailleurs, une version chimère constituée de l'extension N-term du PMEI fusionnée au domaine central du CIF (XPMEI-CIF) inhibe l'activité PME, alors qu'une version du domaine central du PMEI fusionné à l'extension N-term du CIF (XCIF-PMEI) est incapable d'inhiber les activités PME et invertases dans les mêmes conditions (Hothorn *et al.,* 2004b). L'extension N-term du PMEI fusionnée à un domaine central de quatre hélices α (structure hautement conservée entre PMEI et CIF) est donc suffisante pour inhiber l'activité PME. Au contraire l'inactivation de l'activité invertase par les CIFs est dépendante du domaine central. Cela suggère que les PMEIs et les inhibiteurs d'invertases ont développé des mécanismes d'inactivation différents et spécifiques, malgré leurs fortes similarités structurales.

I. 4. e. Implication des PMEs et des PMEIs dans le remodelage des HGs lors de la croissance du tube pollinique :

Comme décrit précédemment, les HGs sont synthétisés dans l'appareil de Golgi et déposés à l'extrémité du tube en expansion sous une forme hautement méthyl-estérifiée (Zhang et Staehelin, 1992). Les HGs méthyl-estérifiés dans la zone apicale pourraient fournir une plasticité suffisante pour soutenir la croissance du tube pollinique (Cheung et Wu, 2008). La dé-méthylestérification des HGs méthyl-estérifiés par les PMEs à l'extrémité du tube est accompagnée d'une libération de protons assurant une modification locale du pH dans la paroi cellulaire du tube pollinique (Micheli, 2001 ; Bosch et Hepler, 2005). En effet, dans les tubes en croissance, des oscillations d'influx (acidification apicale) et d'efflux (bande alcaline) de protons (H^+) (Feijó *et al.,* 1999) ont été observées. Ceci suggère qu'une variation du pH régulerait

l'activité des PMEs (Feijó *et al.,* 1999). Ainsi, la croissance des tubes polliniques pourrait être associée à une régulation des PMEs permettant de maintenir une zone apicale lâche et à l'inverse de rigidifier l'arrière du tube (Figure 29 ; Bosch et Hepler, 2005).

L'influx oscillatoire des H^+ et du Ca^{2+}, qui maintiennent respectivement un pH acide et un gradient de Ca^{2+} à l'apex du tube pollinique, influencerait l'activité des PMEs. De même, l'efflux de H^+ qui maintient la présence d'une bande alcaline en amont de l'apex durant la croissance du tube pollinique pourrait réguler différemment l'activité des PMEs et activer des PGases (Figure 29). D'autres ions tels que le potassium ou le chlore, seraient également capables d'augmenter l'activité des PMEs *in-vivo* (Micheli, 2001 ; Pelloux *et al.,* 2007). Finalement, ces influx oscillatoires pourraient influer directement sur la formation des complexes PMEI-PME pH-dépendant, et sur le clivage de la PRO-région des PMEs du groupe II (Figure 29). Finalement, l'activation des PGases pourrait contrôler le relâchement de la paroi cellulaire du tube pollinique en arrière de la pointe et promouvoir l'impulsion de la croissance propre du tube (Mollet *et al.,* 2013) en contrôlant les propriétés mécaniques de la paroi cellulaire (Figure 29).

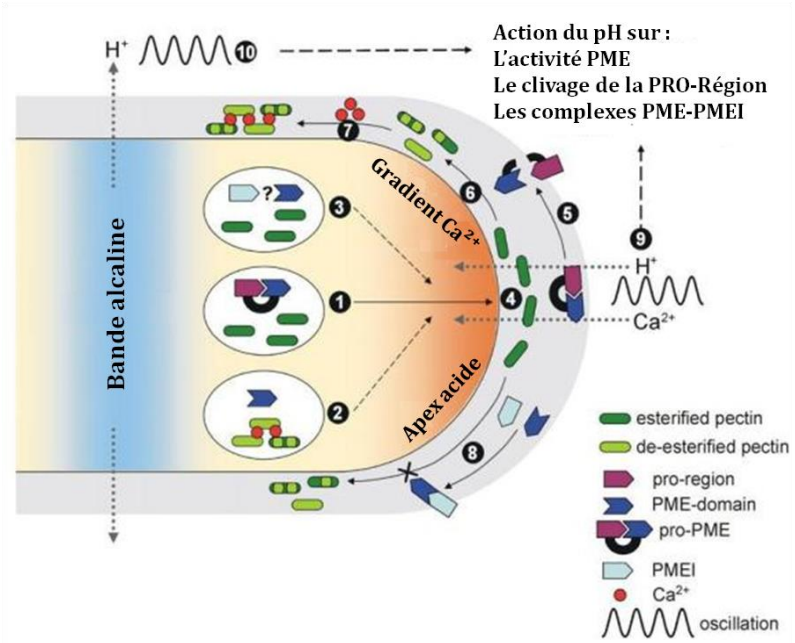


Figure 29 : Effet du pH sur l'activité des PMEs (D'après Bosch et Hepler, 2005).

En effet, la modification des propriétés mécaniques de la paroi en utilisant de faibles concentrations en pectinases exogènes stimule la croissance du tube pollinique et diminue la rigidité du tube (Parre et Geitmann, 2005a ; Zerzour *et al.,* 2009 ; Fayant *et al.,* 2010 ; Palin et Geitmann, 2012). Comme attendu, un excès de pectinases induit dans

un premier temps un gonflement des tubes polliniques au niveau apical puis un éclatement des tubes polliniques. A contrario, la nécessité que les pectines soient méthyl-estérifiées à l'apex du tube pollinique est aisément démontrée par l'application d'un excès de PMEs qui arrête la croissance. Cet arrêt serait apparemment dû à la rigidification de la paroi cellulaire dans la zone apicale en raison de l'interaction des HGs et des ions calciques (Bosch *et al.,* 2005 ; Parre et Geitmann, 2005b ; Palin et Geitmann, 2012). Ceci a également été observé en utilisant du Propidium iodine (PI) sur des tubes polliniques traités avec une PME. Une augmentation dramatique de la fluorescence du PI au niveau apical sur les tubes traités a été observée, due à une augmentation de la dé-méthyl-estérification des HGs (Rounds *et al.,* 2011). Cela suggère que le PI interagirait avec les HGs dé-méthyl-estérifiés et entrerait en compétition avec le calcium.

Parmi les 66 gènes codant pour des PMEs putatives dans le génome d'*A. thaliana*, 14 seraient spécifiques du pollen (Pina *et al.,* 2005 ; Qin *et al.,* 2009 ; Wolf *et al.,* 2009a ; Mollet *et al.,* 2013). Dans Genvestigator, parmi ces 14 isoformes de PMEs, seules 12 sont présentes (Figure 30) car les gènes At5g07410 et At1g69940 ainsi que At2g47040 et At2g47030 présentent de trop grandes similarités dans leurs séquences nucléiques pour pouvoir être différenciées. Sur les 14 PMEs spécifiques du pollen, 5 appartiennent au groupe I et 9 appartiennent au groupe II (avec un domaine PMEI), ce qui suggère que ces PMEIs joueraient un rôle primordial dans la régulation de l'activité des PMEs durant la germination du pollen et la croissance du tube pollinique. De plus, le génome d'*A. thaliana* contient 76 gènes codant pour des PMEIs/inhibiteurs d'invertases putatifs. Des données de transcriptomique ont révélé que ces PMEIs/inhibiteurs d'invertases sont très exprimés dans le pollen d'A*. thaliana* comparé aux autres tissus (Wolf *et al.,* 2003 ; Raiola *et al.,* 2004).

Des approches protéomiques ont aussi permis l'identification de plusieurs PMEs : 2 PMEs putatives dans le pollen germé de maïs (Zhu *et al.,* 2011), une dans le pollen de riz (Dai *et al.,* 2006) et une dans les tubes polliniques d'*A. thaliana* (Ge *et al.,* 2011). Dans les tubes polliniques du tabac, des analyses biochimiques ont montré la présence de 7 isoformes ayant le même pI (point isoélectrique) (Li *et al.,* 2002). Deux de ces isoformes sont co-localisées avec les HGs méthyl-estérifiés dans la paroi et dans les vésicules de sécrétion provenant du Golgi, suggérant que ces PMEs sont transportées jusqu'à l'apex du tube pollinique sous leur forme inactive (Li *et al.,* 2002).

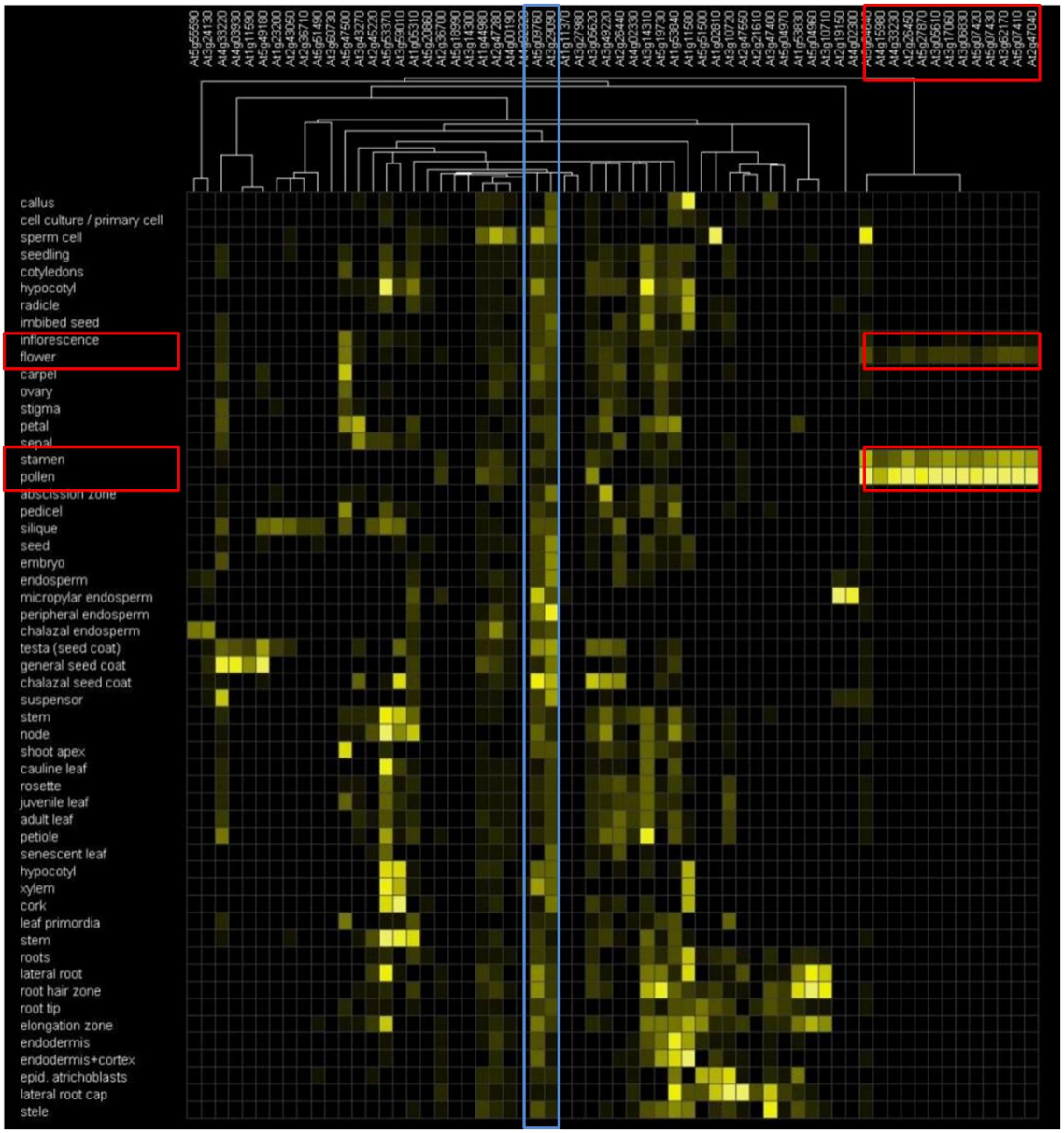


Figure 30 : Expression des PMEs dans l'ensemble des tissus chez *A. thaliana*.
Certaines PMEs sont ubiquitaires (carré bleu) tandis que d'autres sont très spécifiquement exprimées dans certains tissus, en particulier dans le pollen (carrés rouges).

La première caractérisation fonctionnelle de gènes *PME*s et leurs rôles cruciaux dans la croissance des tubes polliniques a été obtenue à partir de deux lignées mutantes : *vanguard1* (*vdg1*) et *ppme1*, codant respectivement pour une PME du groupe 2 (VANGUARD1) et pour une PME du groupe I (PPME1). Le mutant *vdg1*, dont le gène At2g47040 codant pour une PME pollen spécifique est inactivé, présente des tubes polliniques instables *in-vitro* et dont la croissance est fortement ralentie *in-vivo* (Jiang *et al.,* 2005). L'étude d'un autre mutant, *ppme1*, dont le gène *PPME1* est inactivé, présente des anomalies au niveau de la forme des grains de pollen, ainsi qu'au niveau du taux de

la germination, indiquant que cette PPME1 est nécessaire pour l'intégrité de la paroi et pour la croissance polarisée (Tian *et al.,* 2006).

Plusieurs études ont aussi montré l'importance des PMEIs dans la croissance des tubes polliniques. En effet, un apport exogène du PMEI de maïs purifié (*Zm*PMEI1) sur des tubes polliniques de cette même espèce, altère leur croissance en déstabilisant la paroi dans la zone subapicale du tube pollinique (Woriedh *et al.,* 2013). Des résultats similaires ont été obtenus en apportant du PMEI de kiwi à une culture de tubes polliniques d'*A. thaliana* (Paynel *et al.,* 2014). Récement, une étude de transcriptomique sur le pollen du lys a mis en évidence des gènes surexprimés dans le gamétophyte mâle par rapport aux organes végétatifs, et parmi ceux-ci, on retrouve une PME ainsi qu'une PMEI (Lang *et al.,* 2015). De plus, des plantes d'*A. thaliana* transgéniques, transformées avec la version anti-sens du gène de brocoli *Bo*PMEI1 sous contrôle d'un promoteur 35S, présentent une suppression de l'expression du gène orthologue (At1g10770). Ceci conduit à une diminution de l'allongement du tube pollinique associé à une stérilité partielle des gamètes mâles et un rendement en graines diminué (Zhang *et al.,* 2010).

Il a également été montré que PPME1 et *At*PMEI2, tous deux spécifiques du pollen, pouvaient interagir physiquement et des tests *in-vitro* ont révélé que *At*PMEI2 était capable d'inactiver PPME1 (Röckel *et al.,* 2008). De plus, l'expression transitoire de *PPME1* et *AtPMEI2* dans des tubes polliniques de tabac a démontré que PPME1 était accumulée uniformément dans la paroi le long du tube pollinique, tandis que *At*PMEI2 avait une localisation restreinte à l'apex du tube et dans les vésicules de sécrétions, suggérant sa possible internalisation et recyclage (Röckel *et al.,* 2008 ; Wolf *et al.,* 2003).

L'ensemble de ces données indique que les PMEs et PMEIs sont importants dans le remodelage précis des HGs dans la paroi et la régulation de la croissance des tubes polliniques.

OBJECTIF DU SUJET DE RECHERCHE :

Les recherches abordées au cours de cette thèse ont été réalisées sur le pollen d'*A. thaliana*. Le tube pollinique est une cellule unique présentant une forte croissance polarisée avec une sécrétion massive de composés pariétaux et en particulier des HGs méthyl-estérifiés. De ce fait, il représente un excellent modèle d'étude pour comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la biosynthèse de la paroi et de son remodelage. Afin d'étudier les PMEs spécifiques du pollen, de déterminer leurs rôles dans la croissance du tube pollinique *in-vitro* ou *in-vivo* et leurs implications dans le remodelage des HGs dans la paroi, la plante modèle *A. thaliana* a été choisie en raison des nombreuses ressources disponibles (génome séquencé, bases de données, mutants…). A ce jour, seulement deux PMEs, *VANGUARD1* (*VGD1*, At2g47040) et *PPME1* (At1g69940), sur les 14 PMEs putatives spécifiques du pollen ont été étudiées.

Par conséquent, l'objectif de mon travail a été d'isoler et de caractériser des lignées de mutants homozygotes pour des PMEs exprimées spécifiquement dans le pollen. Ce travail a compilé des approches multidisciplinaires telles que la bioinformatique, les biostatistiques et le traitement d'images et des méthodes expérimentales dont la culture cellulaire *in-vitro*, les croisements permettant l'analyse *in-vivo*, la biologie moléculaire, l'imagerie cellulaire et l'immunomarquage et la biochimie des PMEs et de la paroi.

Plusieurs lignées mutantes ont été étudiées au cours de mon projet. Le travail le plus abouti est sur la lignée mutante *pme48* (At5g07410) dont le gène code pour une PME du groupe I. Deux mutants homozygotes knock-out ont été utilisés (la lignée SALK_122970 nommée *pme48-1* et la lignée SALK_007330 nommée *pme48-2*). La PME23 (At3g06830), une PME du groupe 2, a également été étudiée (SALK_035240), ainsi que PPME1, codée par le gène At1g69940. La lignée mutante *ppme1* (SALK_077776) a déjà été caractérisée mais étant l'homologue de PME48, une étude comparative a été entreprise entre ces deux mutants. De plus, des tests de germinations *in-vitro* de pollen sauvage en présence de PMEI de kiwi dans le milieu de germination ont également été entrepris, ainsi qu'en présence d'EDTA, un agent chélateur du calcium, ou encore de PME d'orange. L'ensemble des travaux présentés dans ce mémoire de thèse permettent de mieux comprendre les rôles des PMEs et du calcium au cours de la germination du pollen.

II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

II.1. MATÉRIELS UTILISÉS :

II. 1. a. Le matériel végétal :

Les travaux ont été menés sur des plantes d'*Arabidopsis thaliana*, écotype Columbia (Col-0) sauvages et mutantes des collections SALK (SALK Institute Genomic Analysis Laboratory, SIGnAL, Etats-Unis) et NASC (Nottingham Arabidopsis Stock Centre).

Pour le gène *PME48* (At5g07410), deux lignées mutantes *pme48-1* (SALK_122970) contenant une insertion d'ADN de transfert (ADN-T) 1423 paires de bases (pb) en aval du codon START et *pme48-2* (SALK__007330) contenant une insertion d'ADN-T 1096 pb en aval du codon START ont été utilisées. Une lignée d'insertion a été étudiée pour le gène *PPME1* (At1g69940). Il s'agit de la lignée *ppme1* (SALK__077776, Tian *et al.,* 2006) contenant une insertion d'ADN-T 60 pb en aval du codon START. Enfin, le gène *PME23* (At3g06830) a été étudié à l'aide du mutant *pme23-1* (SALK_035240) contenant une insertion d'ADN-T 516 pb en aval du codon START. Les cartes génomiques de ces séquences ainsi que la position de l'insertion de l'ADN-T pour chaque lignée sont présentées dans l'Annexe 3.

Trois lignées contenant le gène rapporteur *GUS* sous le contrôle des promoteurs des gènes *PME48*, *PME23* et *PPME1* ont aussi été utilisées (Louvet *et al.,* 2006). Ces lignées ont été fournies par le Prof. J. Pelloux (Laboratoire BIOPI, EA3900, Université de Picardie).

II. 1. b. Les souches bactériennes :

Escherichia coli : une préparation commerciale de bactéries *E. coli*, souche DH5α, thermocompétentes (« *subcloning efficiency* », Invitrogen) a été utilisée afin d'amplifier les plasmides. Elle se développe à 37°C dans du milieu Lysogeny Broth (LB).

Agrobacterium tumefaciens : la souche d'*A. tumefaciens* GV3101::pSOUP a été utilisée afin de transformer les plantes d'*A. thaliana* (Hellens *et al.,* 2000). Cette souche

présente une triple résistance aux antibiotiques : tétracycline (tétra), rifampicine (rif) et gentamicine (genta) et se multiplie à 28°C dans du milieu LB.

II. 1. c. Les vecteurs plasmidiques :

Le vecteur plasmidique pPLV06 (N° d'accession GenBank : JF909459, De Rybel *et al.,* 2011) a été utilisé pour l'analyse de l'expression du promoteur du gène *PME48* (*PRO*$_{PME48}$). Ce vecteur de 5827 pb fait partie d'une série de vecteurs binaires maintenant disponibles au NASC et compatibles avec l'utilisation d'une stratégie de clonage « LIC », *Ligation-Independent Cloning* (Li et Elledge, 2007, Eschenfeldt *et al.,* 2009). Le clonage orienté d'un fragment d'ADN amplifié par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est possible grâce à l'addition d'adaptateurs « LIC » aux amorces (Figure 31). Dans le cas du plasmide pPLV06, la séquence du promoteur est clonée en fusion avec une séquence signal de localisation nucléaire SV40 (Lyssenko *et al.,* 2007) couplée à la séquence codant la protéine fluorescente sYFP (*super YELLOW FLUORESCENT PROTEIN*)(Kremers *et al.,* 2006). Ce vecteur plasmidique confère aux bactéries une résistance à la kanamycine (kana).

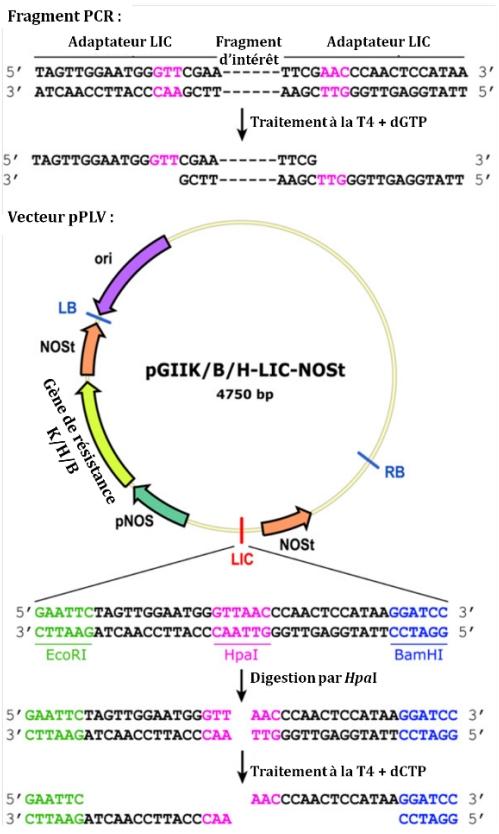


Figure 31 : Représentation schématique de la technique LIC ainsi que des plasmides pPLV (D'après De Rybel *et al.,* 2011).

II. 2. MÉTHODOLOGIE EXPÉRIMENTALE DES CULTURES :

II. 2. a. Culture et transformation des plantes :

Stérilisation des graines :

Les graines sont submergées pendant 5 min dans 1 mL d'une solution d'hypochlorite de sodium commerciale diluée au tiers (soit 2,6 % de chlore actif) puis rincées trois fois dans 1 mL d'eau stérile. Les graines sont ensuite immergées pendant 5 min dans 1 mL d'éthanol 50 % et rincées de nouveau trois fois dans 1 mL d'eau stérile.

Mise en culture des plantes :

Culture en terre : les graines stockées à 4 °C sont semées non aseptisées à la surface du terreau préalablement stérilisé par autoclavage (1 bar, 30 min) et mises en croissance dans un phytotron avec une photopériode de 16 h jour / 8 h nuit (20 °C pendant le jour et 16 °C la nuit) avec 60 % d'humidité. Des arrosages tous les deux jours ont été réalisés.

Culture *in-vitro* : les graines stérilisées sont déposées sur un milieu Murashige and Skoog (1962) (MS, Kalys-Duchefa) concentré 0,5X (4,3 $g.L^{-1}$) contenant 5 % (poids / volume ; p/v) de saccharose et 7 % (p/v) d'agar bactériologique européen (Conda-pronadisa). Ces semis sont réalisés dans des boîtes de Pétri carrées de 12 cm x 12 cm et elles sont placées 2 jours à 4 °C pour la stratification. Elles sont ensuite déposées verticalement dans une chambre de culture avec une intensité lumineuse de 200 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ à 21 °C avec une alternance jour/nuit 16 h/8 h. Après 15 jours de culture, les plantules sont transférées en terre, recouvertes d'une cloche pour maintenir une forte humidité pendant les premiers jours suivant le repiquage.

Transformation des plantes avec *A. tumefaciens* par « *floral dip* » :

Des plantes au stade « hampe florale » ont été transformées génétiquement par « floral dip » (Zhang *et al.,* 2006) en mettant en contact les fleurs avec une solution d'*A. tumefaciens* portant le vecteur d'expression (cf. II. 3. c.). Les bactéries transformées sont

transférées dans un bécher et les hampes florales sont submergées entre 7 et 10 min. Les plantes sont ensuite placées horizontalement, enfermées dans un sac transparent afin de maintenir une forte humidité et laissées à l'obscurité pendant 16 h. Elles sont replacées verticalement à la lumière en gardant les sacs transparents. Après 3 à 5 semaines de culture, les graines ont été collectées et soumises à sélection (Clough et Bent, 1998).

II. 2. b. Récolte et culture du pollen :

Culture *in-vitro* du pollen en milieu liquide :

Les fleurs fraîchement ouvertes sont récoltées à l'aide d'une pince brucelle et regroupées par 40 dans des tubes Eppendorf contenant 1 mL de milieu de germination liquide (MGL). Ce milieu, optimisé par Boavida et McCormick (2007), se compose de 5 mM $CaCl_2$, 0,01 % (p/v) H_3BO_3, 5 mM KCl, 1 mM $MgSO_4$, $7H_20$ et 10 % (p/v) de saccharose. Pour les cultures à différentes concentrations en calcium, les 5 mM de $CaCl_2$ sont remplacés par 7,5 mM ou 10 mM de $CaCl_2$, les autres composants du milieu restent inchangés. Le pH est très exactement ajusté à 7,5. Les tubes sont agités manuellement pour libérer les grains de pollen dans le milieu pendant 5 min. Les fleurs sont éliminées à l'aide d'une pince avant de centrifuger les tubes pendant 5 min à 3200 *g*. Le MGL est enlevé et 250 µL de MGL frais sont ajoutés pour une culture en pilulier. Les grains de pollen sont placés à 22 °C pendant 2, 4, 6, 8, 10, 16 ou 24 h à l'obscurité sans agitation.

Culture *in-vitro* du pollen sur milieu solide :

Les fleurs fraîchement ouvertes sont récoltées à l'aide d'une pince brucelle dans des tubes Eppendorf. Dans le MGL précédemment décrit a été ajouté 1,5 % d'agarose *low-melting* (p/v). La solution est déposée sur une lame de microscope après dissolution de l'agar par chauffage. Lorsque le milieu est solidifié, les fleurs sont tapotées délicatement au dessus du milieu afin d'y déposer les grains de pollen. Les lames sont placées dans une boîte étanche dont l'atmosphère est saturée en vapeur d'eau (humidité relative de 100%). Les boîtes sont incubées à 22 °C à l'obscurité sans agitation pendant 2, 4, 6, 8, 10, 16 ou 24 h.

Culture *in-vitro* du pollen en milieux modifiés :

Ajout de PMEI : du PMEI de kiwi (*Ac*PMEI, accession number P83326) purifié (Paynel *et al.,* 2014) a été utilisé afin d'étudier l'effet de cet inhibiteur de PME sur la germination des grains de pollen et la croissance des tubes. Le pollen est récolté comme indiqué ci-dessus (Culture *in-vitro* du pollen en milieu liquide) à la différence qu'après centrifugation, le culot de grains de pollen a été repris dans 720 µL de MGL. 90 µL de MGL contenant le pollen de 5 fleurs sont transférés dans un puits de plaque 96 puits. Dix microlitres d'eau, de PMEI, ou d'un mélange des deux sont ajoutés dans le MGL afin d'obtenir des concentrations de PMEI de 0, 4, 10 et 20 µM. Les grains de pollen sont alors mis en culture à l'obscurité à 22°C durant 6 h. Le pourcentage de germination a été évalué sous lumière transmise à l'aide d'un microscope.

Ajout d'EDTA : l'effet de la présence d'EDTA a été suivi en plaçant les grains de pollen dans du MG supplémenté par 1 mM d'EDTA. Ces cultures ont été réalisées en milieu solide et liquide.

Ajout de PME d'orange : l'effet de PME exogène a été testé en utilisant la PME commerciale d'orange (Sigma) à une concentration finale variant de 0,01 à 20 $mg.mL^{-1}$ en MGL. Cette PME est une PME à activité processive. La séquence protéique de son domaine catalytique a été alignée avec les domaines catalytiques des PME48 et PPME1 (Annexe 1).

Ajout de Calcium : l'influence de la concentration en calcium a été étudiée en milieu liquide et solide en modulant la concentration de $CaCl_2$ à 5 mM (milieu optimal), 7,5 mM et 10 mM.

Culture du pollen *in-vivo* :

Des fleurs immatures sont émasculées. Les sépales, pétales et étamines sont enlevés et le pistil immature est protégé par un sac en papier afin d'éviter une pollinisation indésirable. Les plantes émasculées sont replacées au phytotron jusqu'à ce que le pistil soit mature (72 h maximum). Une fois mature, le pistil est pollinisé manuellement en déposant sur le stigmate le pollen issu de plantes mutantes ou sauvages. Après 6, 16, 24 ou 48 h, le pistil est fixé dans une solution d'acide

acétique/éthanol (1/3, volume/volume ; v/v) et conservé à 4°C avant coloration à l'aniline bleue.

Impact de la mutation sur les siliques et la production de graines :

Une centaine de siliques matures provenant de plantes sauvages et mutantes *pme48-1, pme48-2*, *ppme1* et *pme23-1* a été mesurée et le nombre de graines dans chaque silique a été compté.

II. 2. c. Manipulation des souches bactériennes :

Cultures bactériennes :

Pour l'ensemble des expérimentations avec *A. tumefaciens*, les bactéries sont cultivées à 28 °C sous agitation à 200 rotations par minute (rpm). Pour *E. coli*, la multiplication des bactéries s'est effectuée à 37 °C et à 200 rpm en milieu liquide.

Transformation d'*E. coli* par choc thermique :

Cinquante microlitres de cellules DH5α thermocompétentes (Invitrogen) sont mélangés à 10 ng de réaction de ligation. Le mélange est laissé pendant 30 min sur la glace, incubé durant 45 s à 42 °C et remis pendant 2 min sur la glace. Neuf cents microlitres de milieu SOC (Super Optimal broth with Catabolite repression, milieu de culture utilisé pour obtenir le meilleur rendement lors de transformation d'*E.coli* d'après Hanahan, 1983) sont ajoutés et les bactéries sont ensuite incubées pendant 1 h à 37 °C. Cent à 200 microlitres de suspension bactérienne, après concentration par centrifugation, sont étalés sur milieu LB solide (10 $g.L^{-1}$ de tryptone, 5 $g.L^{-1}$ d'extrait de levure, 10 $g.L^{-1}$ de NaCl et 10 $g.L^{-1}$ agar bactériologique Européenne) contenant l'antibiotique de sélection. Les boîtes de Pétri sont incubées pendant 16 h à 37 °C.

Le milieu SOC est utilisé avec les bactéries « *library efficiency* » ; pour les « *subcloning efficiency* » (DH5α), on utilise en général du LB.

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

Cinq cent microlitres de bactéries *A. tumefaciens* compétentes sont mélangés à 10 µg de vecteur. Le mélange est laissé pendant 5 min sur glace, incubé durant 5 min dans l'azote liquide puis pendant 5 min à 37 °C. Huit-cent microlitres à 1 mL de milieu LB sont ajoutés et les agrobactéries sont mises en culture pendant 4 h à 28 °C sous agitation (200 rpm). La culture est ensuite centrifugée à 5000 *g* pendant 30 s, 800 µL de milieu LB sont éliminés et le culot est repris dans les 200 µL restant. Les agrobactéries transformées sont étalées sur du milieu LB contenant les antibiotiques adéquats et placées dans une étuve à 28°C pour une durée de 48 h à 72 h.

II. 3. BIOLOGIE MOLÉCULAIRE :

II. 3. a. Extraction et purification d'ADN :

Extraction d'ADN génomique :

Une ou deux feuilles sont prélevées puis broyées dans un tube Eppendorf stérile à l'aide d'un pilon dans 400 µL de tampon d'extraction (Tris-HCl pH 7,5 200 mM, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM, SDS 0,5 %). Après homogénéisation, le mélange est centrifugé pendant 1 min à 14000 *g* et 200 µL du surnageant sont transférés dans un nouveau tube. Deux cent microlitres d'isopropanol sont ajoutés avant d'agiter le tube par retournements puis de le laisser à température ambiante pendant 5 min. L'ADNg est concentré par centrifugation de 5 min à 14000 *g*, le surnageant est éliminé et le culot d'ADNg est rincé 2 fois à l'éthanol 70 % avant d'être séché à l'air. L'ADNg est repris dans 100 µL d'eau milliQ stérile et incubé à 60 °C pendant 10 min avant d'être stocké à -20 °C jusqu'à utilisation.

Extraction d'ADN plasmidique :

La minipréparation d'ADN plasmidique est réalisée avec le kit *PureYield Plasmid Miniprep System*® (Promega), selon les instructions du fournisseur. La préparation d'ADN plasmidique en quantité plus importante a été réalisée avec le kit *plasmid DNA purif Nucleobond Xtra Midi+*® (Macherey-Nagel), selon les instructions du fournisseur.

II. 3. b. Analyse de l'ADN :

Amplification par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) :

Pour le génotypage, la Taq polymérase "*GoTaq™ DNA Polymerase*" (Promega) a été utilisée selon les instructions du fabricant. La réaction est effectuée avec 5 µL d'ADN matriciel (100 ng) dans le milieu réactionnel suivant : 0,5 µM de chaque amorce, 0,2 mM d'un mélange de dNTPs, 1X de tampon PCR (Promega) et 0,5 U d'ADN polymérase (GoTaq, Promega) ainsi que de l'eau stérile pour un volume final de 25 ou 50 µL (cf. II. 3. d. Tableau 6). Les paramètres thermocycliques ont été choisis en fonction des Tms (température de fusion ; *melting temperature*) des amorces pour la température d'hybridation et de la longueur du fragment à amplifier pour la détermination du temps d'élongation.

Afin de réduire au maximum les erreurs d'amplification, pour les clonages de promoteurs et séquences codantes, la Polymérase "*Extensor Hi-fidelity*" (Thermo Scientific) a été utilisée en suivant les recommandations du fournisseur.

Digestion enzymatique des produits de PCR et des plasmides :

La digestion des plasmides est effectuée à l'aide d'enzymes de restriction (New England, Biolabs). Dans la majeure partie des cas, les digestions sont réalisées dans les conditions standards, à la température optimale de l'enzyme. Les quantités d'enzymes utilisées sont déterminées en fonction de la quantité d'ADN initial, avec 5 U d'enzyme de restriction pour 1 µg d'ADN.

Electrophorèse d'ADN :

L'ADN est analysé par électrophorèse non dénaturante en gel d'agarose (0,8 à 1,2 % ; p/v selon la taille des fragments), contenant du bromure d'éthidium (BET) (LifeTechnologies) à raison de 100 $ng.mL^{-1}$ dans du tampon TAE 0,5X (Tris-Acetate-EDTA, pH 8). Du *Gel Green* (VWR) ou du *SafeView* (Gentaur) ont également été utilisés dans les conditions préconisées 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), puis déposés dans les puits du gel d'agarose. Les produits de PCR et de digestions d'ADN sont visualisés sous lumière UV (λ=312 nm). La migration de l'ADN est comparée à celle d'un marqueur de taille moléculaire (*Smart Ladder*, Eurogentec).

Séquençage de l'ADN :

Le séquençage des plasmides recombinés est effectué par la société GATC Biotech (GATC Biotech AG, Constance, Allemagne). Les séquences déterminées sont alignées avec les séquences disponibles sur TAIR (http://www.arabidopsis.org/), à l'aide de logiciels d'alignement tels que BLAST (http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) et ClustalW (http://www.genome.jp/tools/clustalw/).

II. 3. c. Etude de l'expression du promoteur de la PME48 : *PRO$_{PME48}$*

Clonage et purification de la séquence du promoteur du gène *PME48* :

Une lignée de plantes d'*A. thaliana* contenant la protéine fluorescente YFP sous le contrôle du promoteur du gène *PME48* (*PRO$_{PME48}$*) a été créée. Une construction plasmidique contenant la séquence *PRO$_{PME48}$* clonée dans le plasmide pBI101.3 nous a été fournie par le Pr. J. Pelloux (Laboratoire BIOPI, EA3900, Université d'Amiens). La séquence du promoteur a été amplifiée à l'aide des amorces présentées dans le Tableau 1. Le produit d'amplification PCR obtenu (amplicon) est séparé sur gel d'électrophorèse (0,8 % agarose, Promega), 100 mV de voltage, durant 35 min) puis purifié à l'aide du kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) en suivant les recommandations du fournisseur. Les conditions d'amplification par PCR sont présentées dans la partie II. 3. d.

Tableau 1 : Liste des amorces pour la construction plasmidique. Les séquences adaptatrices LIC sont surlignées en vert.

Amorces	Séquences
***PRO$_{PME48}$*_LIC06_For**	**TAG-TTG-GAA-TGG-GTT-CGA-ATT-CTT-CGT-TTG-GTT-GGG-TTT-A**
***PRO$_{PME48}$*_LIC06_Rev**	**TTA-TGG-AGT-TGG-GTT-CGA-ATT-GAA-TTT-CGT-TTT-CGT-TTG-C**

Principe de la technique LIC et insertion dans le vecteur pPLV (LIC compatible) :

La technique LIC consiste à amplifier un fragment d'intérêt par PCR en ajoutant aux amorces des séquences adaptatrices LIC. Les fragments ainsi amplifiés sont traités à la T4 DNA polymerase en présence d'un excès de dGTP. Le plasmide pPLV06 (De Rybel *et al.,* 2011) est LIC compatible, ainsi après digestion de celui-ci par l'enzyme de restriction *Hpa*I, il est traité à la T4 DNA polymérase en présence d'un excès de dCTP. Les vecteurs linéarisés ainsi que les fragments PCR s'hybrident entre eux grâce aux extrémités cohésives créées *via* les adaptateurs LIC par l'activité 3'-5' exonucléase de la T4 DNA polymérase (Figure 31).

Construction:

La construction à réaliser est la suivante : PRO_{PME48}:sYFP dans le plasmide pPLV06 (Tableau 2) pour l'analyse du promoteur PRO_{PME48}. (Figure 31). Il est à noter que le plasmide contient aussi un site d'adressage de la sYFP dans le noyau (nuclear localization signal, NLS_{SV40}).

Tableau 2 : Nom du plasmide utilisé, son utilisation, ses caractéristiques, ainsi que les séquences des adaptateurs pour les amorces *Forward* et *Reverse* (D'après De Rybel *et al.,* 2011).

Utilisation	**Analyse du promoteur**
pPLV	**pPLV06**
Vecteur	**pGIIK-LIC-SV40-sYFP-NOSt**
Antibiotique de résistance	**Kanamycine**
Séquence adaptatrice amorce L 5' - 3'	**TAGTTGGAATGGGTTCGAA**
Séquence adaptatrice amorce R 5' - 3'	**TTATGGAGTTGGGTTCGAA**

Linéarisation du vecteur plasmidique par *Hpa*I :

Le vecteur pPLV06 est linéarisé par digestion enzymatique avec *Hpa*I. Pour cela, 2-4 µg d'ADN plasmidique est digéré avec 1 µL d'enzyme *Hpa*I (NE Biolabs) pendant 2 h à 37 °C dans un milieu réactionnel dont la composition est présentée dans le Tableau 3. Puis, la linéarisation est vérifiée par migration d'une aliquote (1-2 µL) en gel d'agarose (0,8 %). Ensuite, un gel d'agarose préparatif suivi d'une purification de l'ADN avec le kit

Wizard® SV gel and PCR Clean-Up System (Promega) permet de purifier le vecteur linéarisé. Une migration en gel d'agarose est réalisée pour le dosage de l'ADN purifié.

Tableau 3 : Composition du milieu réactionnel pour la linéarisation par *Hpa*I.

H2O mQ	**qsp 50 µL**
Tampon NEBuffer4	**5 µL**
ADN	**2-4 µg**
HpaI	**1 µL**
Volume final	**50 µL**

Amplification PCR de l'insert :

La séquence du promoteur PROPME48 a été amplifiée à l'aide des amorces présentées dans le Tableau 1. Le milieu réactionnel de la PCR est présenté dans le Tableau 6 et les conditions du thermocycleurs sont présentées dans le Tableau 7.

Traitement à la T4 DNA polymérase :

Une fois les produits de PCR purifiés, ceux-ci et le vecteur pPLV06 ont subi un traitement avec la polymérase T4 DNA (NE Biolabs) avec un excès de dGTP ou dCTP, respectivement (Tableau 4). Environ 400 ng de vecteur linéarisé et 200 ng de produit PCR purifié sont traités en parallèle (Tableau 4).

Tableau 4 : Composition du milieu réactionnel pour les traitements à la T4 ADN polymérase.

H2O mQ	**qsp 40 µL**
ADN vecteur linéarisé	**200-400 ng**
Tampon T4 10x	**4 µL**
100 mM de dCTP (Vecteur linéarisé) **ou dGTP (Produit PCR)**	**4 µL**
DTT 100 mM	**2 µL**
BSA (10mg/mL)	**0,4 µL**
T4 ADN polymérase (NEB)	**0,8 µL**
Volume final	**40 µL**

Le mélange est centrifugé pendant 1 min à la vitesse maximale, puis incubé à 22 °C pendant au moins 30 min (et jusqu'à 2 h). Ensuite, l'enzyme est inactivée par

incubation à 75 °C pendant 20 min, puis une nouvelle centrifugation est réalisée pendant 1 min à la vitesse maximale. Le vecteur et l'insert traités « T4 » sont stockés à 4 °C jusqu'à utilisation.

Afin de les lier, l'insert (10-40 ng) est combiné avec le vecteur linéarisé pPLV06, tous deux traités précédemment à la T4 DNA polymérase, avec un rapport molaire de 1:3 (en général environ 1 à 3 µL de chaque). Après incubation à 22 °C pendant 30 min à 2 h ou à 4 °C pendant une nuit, la totalité de ce mélange est utilisée pour transformer *E.coli* (DH5α) par la technique du choc thermique.

Transformation d'*E. coli* et contrôle de la séquence :

Les bactéries *E. coli* transformées sont sélectionnées sur du milieu LB contenant 25 $mg.L^{-1}$ de Kana, et incubées pendant une nuit à 37 °C. Ensuite, les colonies sont criblées par PCR pour vérifier la présence de l'insert. Des pré-cultures des clones positifs sont faites dans 6 mL de LB + $Kana^{25}$ puis l'ADN plasmidique est purifié et validé par digestion avec des enzymes de restriction, avant séquençage de l'insertion.

Obtention de l'expression stable chez *A. thaliana* :

Le plasmide généré est transféré dans *A. tumefaciens* (souche GV3101*::*pSOUP) par choc thermique, et les agrobactéries transformées sont sélectionnées sur milieu LB (voir plus haut) contenant de la rif (50 $mg.L^{-1}$), de la genta (25 $mg.L^{-1}$) et de la tétra (5 $mg.L^{-1}$) ainsi que de la kana (25 $mg.L^{-1}$) qui est la résistance apportée par le plasmide pPLV06. Une colonie isolée d'*A. tumefaciens* est ensuite mise en culture dans 5 mL de milieu LB, contenant les antibiotiques de sélection pendant une nuit à 28 °C et sous agitation à 200 rpm. Ensuite, 5 mL de pré-culture d'*A. tumefaciens* ayant atteint la phase stationnaire sont dilués dans 495 mL de milieu LB contenant les antibiotiques de sélection et laissés de 18 à 24 h sous agitation (200 rpm) à 28 °C. La culture est centrifugée à 5000 *g* à 4 °C et le culot bactérien est repris dans du milieu d'infiltration composé de saccharose 5 % (p/v) et de Silwet L-77 0,02 % (v/v) (http://www.silvet.fr/) pour obtenir une DO_{600} = 0,8. La transformation des plantes d'*A. thaliana* est réalisée par trempage floral (floral dip). (Se référer au paragraphe II. 2. a).

Sélection des plantes transformées :

Les graines transformées sont sélectionnées sur le milieu MS complémenté avec de la kana à la concentration finale de 25 $mg.L^{-1}$, puis sont cultivées jusqu'à la troisième génération, comme décrit dans la partie mise en culture des plantes, condition *in-vitro*. (Se référer au paragraphe II. 2. a).

II. 3. d. Sélection des lignées homozygotes mutantes :

Amplification par PCR :

Deux réactions PCR sont réalisées, la première PCR avec deux amorces qui s'hybrident spécifiquement sur la séquence génomique du gène d'intérêt (exemple pour *PME48* : PME48-1_FP et PME48-1_RP, Tableau 5) et une seconde paire d'amorces composée d'une amorce spécifique du gène d'intérêt (exemple pour *PME48* : PME48-1_FP) et d'une amorce s'hybridant sur l'ADN-T (LBb1.3, Tableau 5) (Figure 32).

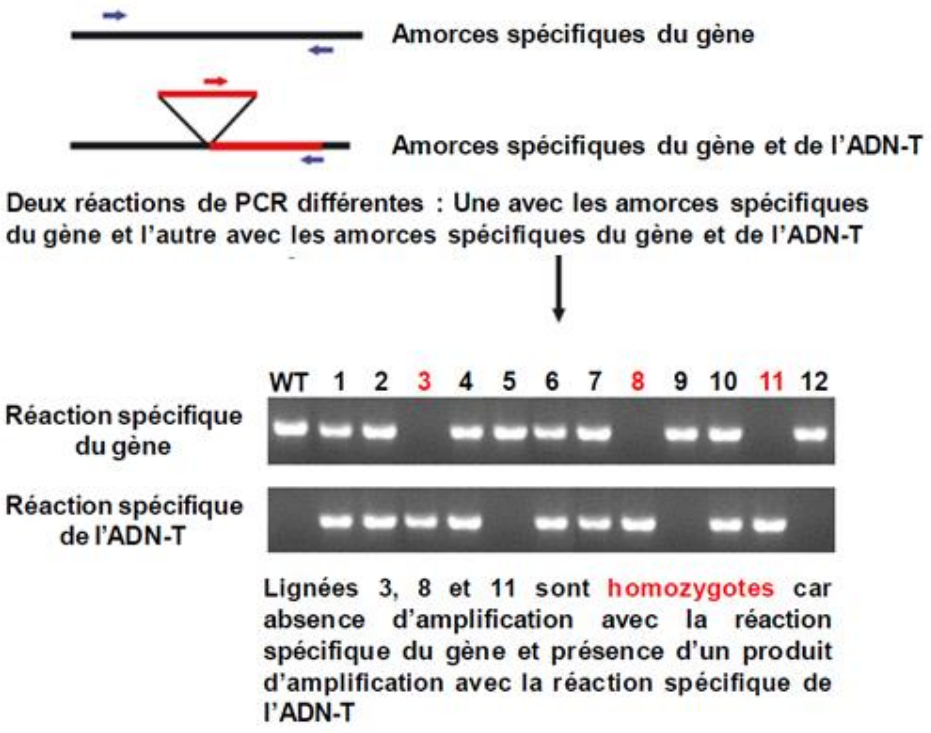


Figure 32 : Représentation schématique expliquant la sélection des lignées homozygotes.

Les amorces utilisées pour la sélection des mutants d'insertion sont données dans le Tableau 5. Les cartes génomiques des mutants sont présentées dans l'Annexe 3

avec la position de l'insertion d'ADN-T, ainsi que la position d'hybridation des différents couples d'amorces. Dans tous les cas, la présence de l'insert est vérifiée par PCR en utilisant les couples d'amorces adéquats (Tableau 5).

Tableau 5 : Liste des amorces utilisées pour le génotypage des mutants d'insertions.

ADN	Gènes	Amorces RP	Amorces FP	TM °C	pb
ADNg WT	*PPME1*	GCGGTACCGTCATAGGTGAT	GTCCATTTTATTAGGCCTGTTG	59	474
	PME48-1	GAAGAGAGGATTTCTGGAAATTGA	TGACAGGACCGTGTTCTACG		315
	PME48-2	GAAGAGAGGATTTCTGGAAATTGA	CTGGAGGAGGAATCTATTTGG		526
	PME23-1	GCACAGCATTTAGAGCATCG	TGGCTCCATCGCATTCCAGCA		455
ADNg mutant	*PPME1*	GCGGTACCGTCATAGGTGAT	LBb1.3 : ATTTTGCCGATTTCGGAAC		669
	PME48-1	LBb1.3 : ATTTTGCCGATTTCGGAAC	TGACAGGACCGTGTTCTACG		402
	PME48-2	LBb1.3 : ATTTTGCCGATTTCGGAAC	CTGGAGGAGGAATCTATTTGG		289
	PME23-1	GCACAGCATTTAGAGCATCG	LBb1.3 : ATTTTGCCGATTTCGGAAC		647

TM, température d'hybridation ; pb, taille de l'amplicon attendue sur de l'ADN matriciel WT.

Les couples d'amorces pour la sélection des lignées mutantes homozygotes sont les suivants : *ppme1* : RP / LBb1.3 taille attendue 669 pb ; *pme23-1* : RP / LBb1.3 taille attendue 647 pb ; *pme48-1* : FP / LBb1.3 taille attendue de 402 bp et *pme48-2* : FP / LBb1.3 taille attendue de 289 bp.

Pour la sélection du mutant *ppme1* : la taille attendue de l'amplification avec ce couple d'amorces est de 474 bp avec de l'ADNg WT. Un second couple d'amorces composé de PPME1_RP et de LBb1.3 permet une amplification de 669 bp avec de l'ADNg d'une plante homozygote *ppme1 .*

Pour la sélection du mutant *pme23-1* : la taille attendue de l'amplification avec les couples d'amorces est de 455 bp avec de l'ADNg WT. Un second couple d'amorces composé de PME23-1_RP et de LBb1.3 permet une amplification de 647 bp avec de l'ADNg d'une plante homozygote *pme23-1*.

Pour la sélection du mutant *pme48-1* : la taille attendue de l'amplification avec le couple d'amorces est de 315 bp avec de l'ADNg WT. Un second couple d'amorces composé de PME48-1_FP et de LBb1.3 permet une amplification de 402 bp avec de l'ADNg d'une plante homozygote *pme48-1*.

Pour la sélection du mutant *pme48-2* : la taille attendue de l'amplification avec le couple d'amorces est de 526 bp avec de l'ADNg WT. Un second couple d'amorces composé de PME48-2_FP et de LBb1.3 permet une amplification de 289 bp avec de l'ADNg d'une plante homozygote *pme48-2*.

Les réactions de PCR semi-quantitatives sont réalisées grâce au mélange réactionnel présenté dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Composition du milieu réactionnel pour la PCR semi-quantitative.

Tampon Go-Taq (5X)	**5 µL**
dNTPs (2,5 mM)	**2 µL**
Amorce R (10 µM)	**0,5 µL**
Amorce L (10 µM)	**0,5 µL**
ADNc matriciel	**2 µL**
Eau stérile	**14 µL**
Enzyme Go Taq	**1 µL**
TOTAL	**25 µL**

Les paramètres du thermocycleur pour la PCR semi-quantitative sont les suivants : chaque cycle de PCR est constitué de trois étapes : la dénaturation permet la séparation des doubles brins d'ADN ; l'hybridation permet l'hybridation des amorces sur la matrice et l'élongation permet la synthèse du brin complémentaire (Figure 24). Pour tous les cas, les conditions du thermocycleur (Applied Biosystem) sont présentées dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Conditions du thermocycleur.

Nombre de cycles	Température	Durée	
Dénaturation initiale	**95°C**	**2 min**	
Dénaturation	**95°C**	**1 min**	**X 34 cycles**
Hybridation	**60°C**	**30 sec**	
Elongation	**72°C**	**45 sec**	
Elongation finale	**72°C**	**5 min**	

II. 3. e. Étude de l'expression des gènes par qRT-PCR :

Extraction des ARN :

Les ARN de grains de pollen secs, imbibés (1 h dans le MGL) ou de tubes polliniques (6 h dans le MGL) sont extraits à partir de 200 fleurs. Le kit *RNeasy plant mini*® (Qiagen) a été utilisé pour les extractions servant aux RT-PCR ainsi que pour la RT-PCR quantitative en temps réel ou qRT-PCR, selon les instructions du fournisseur. L'ensemble des extraits d'ARN est stocké à -80 °C avant utilisation.

Les ARN sont dosés en utilisant le *NanoDrop ND-2000c* (*Thermo Scientific),* spectrophotomètre qui permet la mesure d'échantillons en petite quantité : 0,5 µL disponible sur PRIMACEN (Plate-forme de Recherche en IMAgerie CEllulaire de haute-Normandie, Université de Rouen).

Les rapports des absorbances A260/A280 et A260/A230 permettent d'évaluer la pureté des acides nucléiques présents dans chaque échantillon. Les protéines absorbent majoritairement à 280 nm, les composés humiques et phénoliques majoritairement à 230 nm, et l'ADN majoritairement à 260 nm. Pour considérer un échantillon pur en ARN, le rapport A260/A280 doit être supérieur à 2,0 (pour de l'ADN pur, le rapport doit être compris entre 1,8 et 2,0). Si ce rapport est inférieur à 1,8, la contamination en protéines est considérée comme importante. Le rapport A260/A230 doit être proche de 2,0 afin de pouvoir considérer l'échantillon exempt de contaminants.

Synthèse des ADNc par transcription inverse :

Le principe de la transcription inverse est de synthétiser un ADNc (ADN complémentaire) à partir d'une matrice d'ARN messager. Ceci est rendu possible grâce à la transcriptase inverse. Cette technique permet de rétrotranscrire les ARNm en ADNc, pour être amplifiés et quantifiés par la suite par qPCR. Afin de synthétiser les ADNc, deux protocoles de reverse transcription ont été utilisés :

1) La synthèse des ADNc est réalisée en utilisant la M-MLV reverse transcriptase, RNase H Minus, Point mutant (PROMEGA) pour la PCR semi-quantitative, en suivant les instructions du fabricant.

2) Pour la qRT-PCR, la synthèse des ADNc est réalisée en utilisant la *QuantiTect reverse transcription* (Qiagen), selon les recommandations du fournisseur. Dans ce cas,

des oligo $(dT)_{20}$ à 50 µM final, ainsi que 150 à 200 ng d'ARN totaux traités à la DNAse (Qiagen) sont utilisés. Les réactions sont effectuées en suivant les instructions fournies avec les kits. Les concentrations en ADNc sont exprimées en « équivalent ARN totaux », et normalisées en se basant sur la quantité d'ARN initiale.

PCR semi-quantitative :

Dans un premier temps, l'expression des 14 *PME*s a été suivie par PCR semi-quantitative. Des amorces spécifiques de chaque gène codant pour une PME exprimée dans le pollen ont été dessinées et testées sur de l'ADNc obtenu à partir de pollen sauvage afin de vérifier leurs températures d'hybridations (Tableau 8).

Tableau 8 : Liste des amorces utilisées pour la PCR semi-quantitative sur ADNc.

Type	Gènes	Amorces R 5' - 3'	Amorces L 5' - 3'	Tm °C	pb
PME du groupe I (sans PRO-région)	*PPME1*	GACCTCTCGGTTCTTTGCAT	ACCGGTGGAGGAATTTATTTGG	46	444
	PME48	CATAAATCTCAACTCCTCCATG	CTGGAACTGGAGGAGGAATCT	45	473
	PME49	CCGGCATAAGTCAAGTTGGT	AGACAATAAACGCGGCAATC	57,5	166
	PME50	CCAAGACCTGCCCAAATAGA	ACCAGGTTCACAGGGACAAG	57,5	328
	PME67	ACGCGACAGCATAAGGAACT	GCCTGATGGTTGGACAAACT	57,5	228
PME du groupe II (avec une PRO-région à activité PMEI en N terminal)	*PME13*	CCGTGTTCTTTTGTCCTGGT	GCCGATTTGAAGGTTACCAA	57,5	168
	PME04	GTTCCCGAGACCACACAGTT	ATCCCTCAGTGCCACAGTTC	57,5	216
	PME05	CTGACGACCATTGTTGACGT	AGTGTTAAACTCAGCCCTGG	57,5	216
	PME21	TTTCCAAGCTCCTCGAAAGA	CCCGATGGAGTTGGTTAAGA	57,5	186
	PME23	GCTTCTGGGTTCTTGTCAGC	AAGCGTTCAAGCAGTTTGT	57,5	196
	PME37	ATCACAGTTGCGGATTTTCC	GGTCGAATCTGAGGGATTCA	57	231
	PME43	CGGATAACGAATTCGCAGTT	AGCCGACTTTGCTGTGTTCT	57,5	165
	PME45	GTCGCGTTTTAACCTTTGGA	AGTTGGCTAAGCGCAGTCAT	57,5	181
	PME28	CGGAACACCTTTACCAGGAA	ACTCGGAGGTGCAGAACACT	57,5	152
Gènes de références	*ACT12* At3g46520	GGTGGAGCAACCACTTTGAT	GAGCCACACGGTACCAATCT	57,5	522
	TUB4 At5g44340	CCTCTTCTTCCTCCTCGTAC	AGAGGTTGACGAGCAGATGA	54	350
	UBC9 At4g27960	GGAATTTGGATCGTGGGATTT	GTTTCACCACCCTTTCTTC	57,5	194

La température d'hybridation (Tm en °C) ainsi que la taille des amplicons (en pb) attendue avec de l'ADNc comme ADN matriciel sont données. Les gènes de référence utilisés sont également listés.

Les séquences nucléotidiques spécifiques correspondantes aux gènes d'intérêts et aux gènes de références ont été identifiées chez *A. thaliana* dans la banque de données The Arabidopsis Information Resource (TAIR ; www.arabidopsis.org).

Les amorces ont ensuite été dessinées *via* le programme « QuantPrime » (Arvidsson *et al.,* 2008 ; http://www.quantprime.de/) dans la région codante (CDS : *Coding DNA Sequence*) ou dans les régions non traduites (UTR : *UnTranslated Region*) de la séquence d'intérêt selon plusieurs critères permettant une meilleure spécificité des amorces : une température de fusion (Tm) : 55 °C à 60 °C ; un taux en base G et C : 40 à 70 % ; une longueur des amorces : 16 à 24 nucléotides. Pour la qRT-PCR, il faut également veiller à ce que la taille des amplicons soit inférieure à 130 pb pour une efficacité optimale de l'amplification et supérieure à 70 pb afin de pouvoir les distinguer des éventuels dimères d'amorces.

Ensuite, l'outil *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST ; http://blast.ncbi.nlm.nih.gov) a permis de contrôler que les séquences des amorces ne s'hybrident pas sur d'autres régions du génome d'*A. thaliana*. Après ces vérifications, les amorces ont été commandées auprès de la société Eurogentec (www.eurogentec.com).

Ces amorces ont également été utilisées sur les ADNc issus des mutants *pme48-1* et *ppme1* afin de vérifier l'absence des transcrits d'intérêt chez ces mutants.

PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR) :

On utilise ici le *SYBR® Green I*. Cette molécule est un intercalant de l'ADN qui émet très peu de fluorescence à l'état libre. Lorsqu'il se fixe dans le petit sillon de l'ADN bicaténaire et qu'il est excité à 497 nm, il émet fortement à 520 nm. La fluorescence est mesurée à la fin de chaque étape d'élongation de chaque cycle, l'augmentation de fluorescence traduit donc la formation d'amplicons. La fiabilité de cette technique repose principalement sur la spécificité des couples d'amorces utilisés. La vérification de cette spécificité est contrôlée grâce à la courbe de fusion (*melting curve*). La courbe de fusion traduit la diminution de la fluorescence en fonction de l'augmentation de la température.

Contrairement à une RT-PCR classique en point final, la qRT-PCR permet de suivre en temps réel l'incorporation d'un marqueur fluorescent (*SYBR Green*, Roche) dans les molécules d'ADN nouvellement formées. Elle est réalisée à l'aide d'un instrument *LightCycler® 480* (Roche) et nécessite le logiciel *LightCycler® 480* (version 1.5) et le mélange commercial *Lightcycler® 480 SYBR Green I Master*. Lorsque de l'ADN double brin est formé durant la PCR, celui-ci incorpore le fluorochrome (Figure 33).

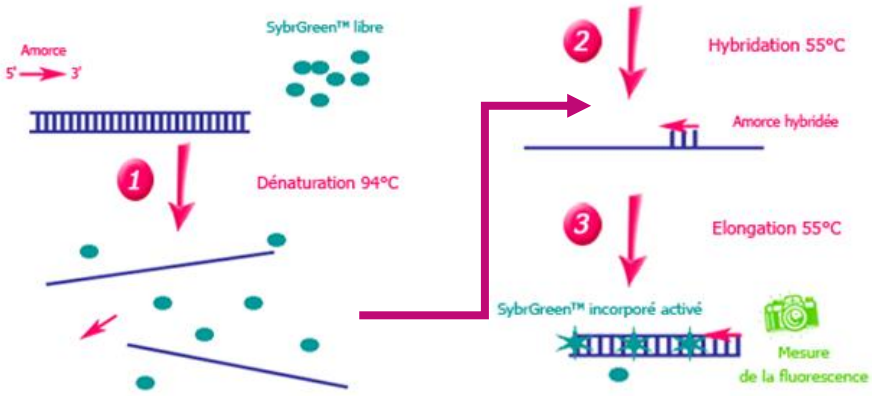


Figure 33 : Principe de la qRT-PCR avec le *SYBR® Green*.
1, Le *SYBR Green* libre émet peu de fluorescence. 2, L'amorce s'hybride sur sa séquence cible. 3, Accroissement de la fluorescence proportionnel à l'intégration du *SYBR Green*, c'est à cette étape que la fluorescence est mesurée avant de recommencer le cycle suivant.

A chaque cycle de PCR, l'intensité de fluorescence est lue. Cette intensité est environ 2 fois plus importante d'un cycle au suivant (ceci dépend de l'efficacité des amorces utilisées). Le logiciel Roche®, détermine le nombre de cycle de PCR nécessaire pour atteindre un seuil de fluorescence détectable par le lecteur. Cette valeur est appelée point de croisement (Cp, Crossing point) et sera utilisée pour quantifier l'expression du gène étudié (Figure 34).

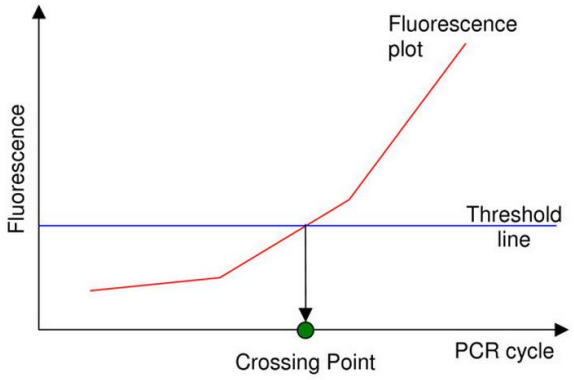


Figure 34 : Schéma représentant le seuil de fluorescence détectable nommé Crossing point (CP) d'après Larionov *et al.*, 2005.

Le Cp est inversement proportionnel au logarithme de base 2 du nombre de copies initiales présentes dans le milieu réactionnel, c.à.d., plus le Cp d'un échantillon est faible, plus son nombre de copies initiales est élevé.

Pour tester l'efficacité des amorces, une PCR quantitative est réalisée sur une gamme de dilution d'ADNc (L'ADNc initial est dilué d'un facteur 3 en cascade). Pour cela, chaque échantillon d'ADNc dilué est utilisé pour faire une RT afin de tester les amorces selon le protocole : *LightCycler® 480 SYBR Green I Master* (ROCHE).

Le milieu réactionnel est composé : de 2,5 µL d'ADNc matriciel et de 7,5 µL du mix constitué de tampon *SYBR Green* (concentration finale 1X), couples d'amorces (à 10 µM final) et de l'eau stérile. Les différentes étapes du programme PCR sont présentées dans le Tableau 9.

Tableau 9 : Les différentes étapes du programme utilisées pour la qRT-PCR.

Programme	Température	Durée
Activation	**95°C**	**10 min**
Amplification	**95°C**	**10 sec**
	60°C	**15 sec**
	72°C	**20 sec**
Fusion	**95°C**	**10 sec**
	60°C	**1 min**
	97°C	**0,11°C/ sec**
Cooling	**40°C**	**30 sec**

Ces réactions sont réalisées en duplicat dans des plaques 384 puits.

Cent soixante-neuf ng d'ARN des différents échantillons ont été transcrits en ADNc en utilisant le kit *QuantiTect reverse transcription* (Qiagen). Une PCR a ensuite été faite en utilisant le milieu réactionnel du Tableau 10.

Tableau 10 : Composition du milieu réactionnel pour la qRT-PCR :

Lightcycler® 480 SYBR Green I Master 2X	**5 µL**
ADNc matriciel	**2,5 µL**
Couple d'amorces (10 µM)	**0,5 µL**
Eau stérile à la fin	**2 µL**
Volume total	**10 µL**

A l'issue de l'expérience, le logiciel reporte dans un graphique les moyennes des Cp en fonction du logarithme de la concentration en ADNc. La pente (a) de ce graphique est utilisée pour calculer l'efficacité (E) selon la formule : $E = 10^{(-1/a)}$

Si pour un couple d'amorces E=2 on a 100 % d'efficacité, c'est-à-dire que l'on double la quantité de molécules d'ADN formées à chaque cycle. Toutes les amorces utilisées ont une efficacité supérieure à 1,8 (entre 1,8 et 2).

Afin de sélectionner des gènes de référence stables, l'expression de 12 gènes a été suivie sur de l'ADNc provenant de grains de pollen secs, imbibés durant 1 h et de tubes polliniques cultivés durant 6 h de plantes sauvages. Parmi les 12 gènes testés, les 3 gènes les plus stables ont été sélectionnés à l'aide du logiciel geNorm (Vandesompele *et al.,* 2002).

Les amorces utilisées pour mesurer l'expression des 14 gènes *PME*s spécifiques du pollen, ainsi que les trois gènes de références (appelés R6, R9 et R12) sont présentées (séquences et efficacité) dans le Tableau 11.

Tableau 11 : Liste des différents couples d'amorces utilisés pour la qRT-PCR.
Leurs efficacités ainsi que la taille des amplicons sont indiquées.

Gènes	Amorces R 5' - 3'	Amorces L 5' - 3'	pb	Efficacités
PPME1	GAGTTTACAAAGCGGGTGGTG	CCAGGATCACACAAAGCCAAG	130	2,055
PME48	CACTCTCTTGGCTTTGTGTGACC	AGACTCCCGCACATGACAAGAC	80	1,9
PME49	GAAAGCAGCCTTATCGCCGTTG	AAACACTTCTCCAATGCCAAAGCC	80	1,97
PME50	GAGGAGGAAGTAGCCATGTGGA	CGAAGTTACGCCTTTCCTCACTC	62	2
PME67	CGGAATGTGCACTCTCTCCTTG	TCGATGCTGTCCCTGTTGGTAAC	83	1,94
PME13	AGCCTGAGGCACTGATCCAA	GGTCATAAACAAGGAGGAGGCTTT	77	1,99
PME04	AACCTGAACTGTGGCACTGAGG	ACAACAGAAGTGTTGCTCTCAGC	62	1,89
PME05	CGTTCACTCTGATAGCCACAGC	TTCCCTTAGTGGCACAGTCCAG	113	1,9
PME21	AGTAGTTTCCAACAATGGCGACAG	CCATGTCGCATCTTGTGTTCATCG	123	1,93
PME23	TCCAGCTGTGTTCTCGATTCCG	GACCTTCCTAACAGCCACAATCAC	79	1,91
PME37	TCCCAATGGACCAGCAGTGTTC	ACCGTTCAGGTCGAATCTGAGG	72	1,92
PME43	CGCAAACGTCTCGTTCCACTTC	TCTTCCCGTGAAAGCCAAGAAC	136	1,94
PME45	TGTTTCCCGTCACGATCGTCTTC	TGCCAAGTACCAAGGAAGGTACAC	134	1,92
PME28	ACTGCCAAGTAATCCGGTTCGC	GCGAGAATCCACGGGATTTGTTC	66	1,94
R6 : **At3g28750**	TGCCCAACTTAACAGCGAGGTC	AGGCGATGGTTATTGCACAAGC	63	1,946
R9 : **At3g57690**	AAAGAGCCAAGAGCTGGCAACG	AAGAAGATTGCTTGCGGTGTGC	131	1,893
R12 : **At5g59370**	CCGTCTTCGTTTGGTGATCTTAGG	GCAGATGTGGATTGCGAAAGCAG	102	1,894

La dernière étape de la PCR, appelée étape de fusion, permet de déterminer si un seul produit de PCR a bien été amplifié dans chaque puits. La courbe de fusion est obtenue en mesurant l'intensité de fluorescence en fonction de l'augmentation de la température. Si le produit amplifié par la PCR est bien unique, alors un seul pic apparaîtra sur cette courbe et le couple d'amorces utilisé sera validé.

L'expression des gènes est calculée en utilisant la formule suivante :

$$(1/ Ec.CPc)/(1/ Er.CPr) \text{ soit } Er.CPr / Ec.CPc$$

avec Ec=efficacité du gène cible, Er=efficacité du gène de référence, CPc=crossing point du gène cible et CPr= crossing point du gène de référence.

Dans le cas de l'analyse de l'expression du gène *PME48*, celle-ci a aussi été mesurée chez le mutant *pme48-1* par rapport à la plante sauvage en utilisant la formule suivante :

$$Ec\Delta CPc/Er\Delta CPr \text{ , ici } \Delta CP=CPsauvage-CPmutant$$

II. 4. MÉTHODOLOGIE EN IMAGERIE CELLULAIRE :

II. 4. a. Enrésinement au méthacrylate et coupe au microtome :

Le méthacrylate :

Le méthacrylate est un sel ou ester de l'acide méthacrylique. Les méthacrylates se polymérisent en donnant les résines méthacryliques, thermoplastiques et incolores, qui ne dénaturent pas les sites de fixation des anticorps : les épitopes restent accessibles pour les immunomarquages ainsi que pour les colorations cellulaires. Cette technique permet de plus, d'obtenir des coupes semi-fines de l'échantillon d'intérêt.

Avant l'enrésinement, les échantillons (pollen sec ou imbibé 1h) ont été fixés dans une solution d'acide acétique / éthanol (1 : 3 ; v/v). Après 3 rinçages à l'éthanol 70%, les grains de pollen sont enrobés dans de l'agarose 2 % (p/v) afin de constituer un bloc contenant les échantillons. Les blocs d'agarose sont enrésinés au méthacrylate en suivant le protocole décrit par Baskin *et al.,* (1992).

Les échantillons sont déshydratés dans des bains successifs d'éthanol (75, 95 et 100%). Les échantillons sont alors traités par des bains croissants (25, 50, 75 et 100%) d'une solution de DTT 10 mM, butylméthacrylate / méthylméthacrylate (4 : 1; v/v) et 20 mM de Benzoin ethyl ether 97 % (Sigma). Après un bain pendant une nuit dans la solution à 100 %, deux bains de 1 h et 2 h dans cette solution à 100 % sont à nouveau réalisés avant de placer les échantillons dans des capsules sous UV (365 nm) à 4 °C durant 24 h pour que la polymérisation ait lieu. Une fois les blocs polymérisés, ceux-ci sont sortis des capsules.

Coupes semi-fines :

Des coupes semi-fines des blocs de résine contenant les grains de pollen secs ou imbibés (1 h dans du MGL) sont réalisées avec un ultramicrotome (UM EC06) disponible sur la plate-forme PRIMACEN. Cet appareil permet de faire des coupes semi-fines (1 µm) et ultrafines (60 nm) à température ambiante. Afin d'avoir des coupes étirées, des vapeurs de chloroforme sont appliquées au-dessus des coupes. Ces coupes sont ensuite déposées sur des lames de diagnostic 10 puits (Ø 6 mm ; VWR) préalablement traitées avec une solution de Poly-L-Lysine 0,01% afin de fixer les coupes sur les lames.

II. 4. b. Marquages cytochimiques :

Coloration GUS :

Le gène *GUS* code pour la β-glucoronidase dont le substrat (X-gluc) est contenu dans le tampon de coloration. La dégradation du X-Gluc par la β-glucoronidase entraîne la formation d'un précipité bleu. Il y aura donc apparition d'une coloration bleue au niveau de la zone d'expression du promoteur lié au gène rapporteur.

La coloration GUS est effectuée sur des grains de pollen secs, des tubes polliniques cultivés *in-vitro* et *in-vivo* sur des fleurs auto-pollinisées. Les fleurs et les grains de pollen secs sont fixés dans une solution d'acétone 80 % sur de la glace pendant 20 min, puis l'acétone est retiré à la pipette pour les fleurs et après centrifugation 7 min à 5000 *g* pour les grains de pollen. Les tubes polliniques n'ont pas été traités à l'acétone mais centrifugés 7 min à 5000 *g* afin d'enlever le milieu de germination.

Les échantillons sont ensuite rincés 3 fois avec du tampon (50 mM de Tampon Phosphate de Sodium ph 7 ; 2 mM de ferricyanide de potassium et 0,2 % de Triton X100). Les échantillons sont incubés dans le tampon de coloration (composé de tampon de rinçage supplémenté de X-Gluc à 1 mM final) à 37 °C, à l'obscurité dans une étuve jusqu'à l'apparition de la coloration (environ 16 h). Les fleurs sont décolorées par des bains successifs d'éthanol 70% et observées sous loupe binoculaire. Les grains de pollen et les tubes polliniques n'ont pas été décolorés mais directement observés au microscope en lumière transmise.

Coloration à l'aniline bleue des tubes polliniques *in-vivo* :

Les pistils pollinisés et fixés (cf. Culture du pollen *in-vivo*) sont réhydratés dans des bains successifs de 10 min dans des solutions d'éthanol à 70, 50, 30% (v/v) puis un bain d'eau milliRO. La décoloration des tissus est réalisée en immergeant les pistils dans une solution de NaOH (8 M) sur la nuit. Le pistil est lavé 5 fois durant 10 min avec de l'eau milliRO afin d'éliminer la soude. Une incubation de 2 h à l'obscurité dans une solution de 0,1 % (p/v) de bleu d'aniline décolorée dans un tampon 100 mM K_3PO_4 à pH 11-12 a permis la détection de la callose et ainsi la visualisation des tubes polliniques dans le pistil en microscopie à fluorescence.

Test de viabilité au FDA (Fluorescein Di Acetate) :

Le principe de la coloration vitale au FDA est le suivant : lorsqu'une cellule vivante est en contact avec FDA qui est non fluorescent, les estérases de cette cellule vont cliver la molécule et la rendre fluorescente (Figure 35). Par conséquent, seules les cellules vivantes fluoresceront.

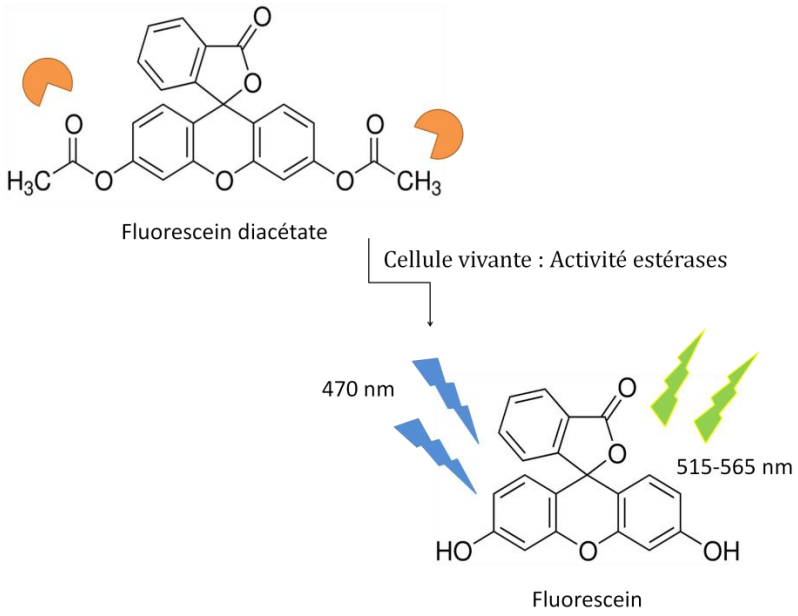


Figure 35 : Schéma représentant l'action des estérases d'une cellule vivante avec le FDA, permettant ainsi l'estimation de la viabilité.
Les estérases sont représentées par les secteurs orange (d'après Daher *et al.*, 2009).

Ainsi par comptage des grains de pollen en lumière transmise comparé au comptage des grains de pollen fluorescents au microscope à épi-fluorescence, on peut déterminer le pourcentage de grains de pollen viables.

La solution mère de FDA (Sigma) à 10 % (p/v dans de l'acétone) est diluée dans une solution de saccharose 10% pour une concentration finale de 0,2 $mg.mL^{-1}$. Des grains de pollen matures et réhydratés durant 30 min dans du MGL sont centrifugés 10 min à 4000 *g* avant d'être repris dans 250 µL de cette solution FDA/saccharose. Le mélange est déposé sur lame et laissé à l'obscurité pendant 5 min avant observation au microscope à épi-fluorescence.

II. 4. c. Immunomarquages :

Immunomarquage de surface :

Des grains de pollen secs, imbibés et des tubes polliniques issus de 80 fleurs et cultivés pendant 6 h sont fixés pendant 2 h dans du tampon (v/v) composé de 100 mM de tampon PIPES, pH 6,9 ; 4 mM $MgSO_4$ $7H_2O$; 4 mM EGTA ; 10 % (p/v) de saccharose et 5 % (v/v) de formaldéhyde, puis déposés sur des lames à puits préalablement traitées avec 0,01 % (v/v) de Poly-L-Lysine.

Les lames sont rincées 3 fois avec une solution tampon Phosphate salin 1X (*Phosphate Buffer Saline*, PBS : 50 mM de tampon PIPES pH 6.9, 2 mM $MgSO_4$ $7H_2O$, 2 mM EGTA). Les sites non spécifiques sont saturés par 30 µL d'une solution de PBS-lait 3 % (p/v) pendant 30 min à température ambiante. Après 3 rinçages avec du PBS, les anticorps primaires (JIM5 et JIM7 ou LM19 et LM20) (Tableau 12) dilués au 1/5ème sont ajoutés et incubés avec les grains de pollen ou les tubes polliniques pendant 16 h à 4 °C.

Tableau 12 : Liste des anticorps monoclonaux dirigés contre les épitopes associés aux HGs.

Anticorps primaire	Organisme de production	Polymère reconnu	Références
JIM 5	**Rat**	HG faiblement méthyl-estérifiés	Clausen *et al.,* 2003
JIM 7	**Rat**	HG fortement méthyl-estérifiés	Clausen *et al.,* 2003
LM 19	**Rat**	HG faiblement méthyl-estérifiés	Verhertbruggen *et al.,* 2009
LM 20	**Rat**	HG fortement méthyl-estérifiés	Verhertbruggen *et al.,* 2009

Les grains de pollen et les tubes polliniques sont rincés 3 fois avec du PBS puis incubés à 30 °C pendant 3 h à l'obscurité avec l'anticorps secondaire anti-rat couplé à la Fluorescéine IsoThioCyanate (FITC), dilué au 1/100ème dans du PBS. Les échantillons sont finalement rincés 3 fois avec du PBS, avant d'être observés sous microscope à épi-fluorescence. Les contrôles négatifs sont aussi réalisés en omettant l'anticorps primaire.

Immunomarquage sur coupes semi-fines :

Les lames sont rincées 3 fois avec une solution de PBS. L'étape de saturation et les étapes suivantes d'immunomarquages sont identiques à celles effectuées pour les immunomarquages de surface (cf. ci-dessus).

II. 4. d. Microscopes, acquisition et traitement d'images :

Une partie des photographies prises en microscopie ont été réalisées à l'aide du matériel disponible sur la plate-forme PRIMACEN ou le plateau technique du GRR Végétal, Agronomie, Sols et Innovations, tous deux financés par la région Haute-Normandie et situés sur le campus de l'Université de Rouen.

Les lames de culture de pollen *in-vitro* et *in-vivo* sont observées en microscopie photonique et à épi-fluorescence (Leica DLMB), et les photographies ont été acquises à l'aide du programme Leica FW4000 et de la caméra Leica DFC300FX.

Pour les colorations à l'aniline bleue, les pistils ont été observés sous UV avec un filtre permettant une excitation entre 320-390 nm et une émission à 461 nm. Pour la coloration vitale au FDA, des grains de pollen ont été observés avec l'excitation sous UV (excitation à 470 nm, émission à 515-565 nm). Finalement pour les marquages FITC, les échantillons ont été observés avec un filtre permettant une excitation entre 485–520 nm et une émission entre 520–560 nm.

Pour le *time laps*, les lames sont placées sur le microscope inversé (Leica DMI 6000B équipé d'une caméra Leica DFC450C et du logiciel LAS) et les images ont été acquises au rythme d'une image toutes les 5 min pendant 6 ou 24 h.

Les observations de la YFP ont été réalisées avec le microscope confocal inversé (Leica TCS SP2 AOBS) équipé du logiciel LAS AS avec un filtre d'excitation à l'Argon, 488 nm ; un filtre d'émission SPC 525 d'une longueur d'onde comprise entre 510 et 530 nm. La puissance du laser, le gain et l'offset sont identiques à chaque prise afin de pouvoir comparer les images entre-elles. Un contrôle approprié a été réalisé sur des grains de pollen de type sauvage pour exclure la possibilité de diaphonie entre l'auto-fluorescence du grain de pollen et le fluorochrome avant l'acquisition de l'image.

Les grains de pollen secs ont aussi été observés en microscopie électronique à balayage (Hitachi TM3000) en mode analytique (15 kV) sans préparation préalable.

L'ensemble des mesures (le pourcentage de germination du pollen, longueur et vitesse de croissance des tubes polliniques …) a été réalisé sur les images à l'aide du logiciel ImageJ (Abramoff *et al.,* 2004). Le plugin d'ImageJ permettant le comptage de cellules : *Cell counter*, a été utilisé. Un grain de pollen a été considéré comme germé lorsque la longueur du tube est au moins égale au diamètre du grain.

II. 5. ANALYSES BIOCHIMIQUES :

II. 5. a. Extraction et dosage des protéines :

Pour les dosages protéiques, enzymatiques ainsi que pour la focalisation isoélectrique suivi du zymogramme: le pollen de fleurs matures WT ou *pme48-1* a été récolté avec un aspirateur d'après la méthode développée par Johnson-Brousseau et McCormick (2004). Après élimination des débris, le pollen est broyé à l'aide d'un micropotter dans un tube eppendorf de 1,5 mL avec 400 µL de tampon d'extraction contenant Na_2HPO_4 50 mM, acide citrique 12,5 mM, NaCl 1M, Tween 20 0.01 % (v/v), PVPP 0,2 % et de l'anti-protéase (Roche), pH 7.5. Les broyats sont incubés sous agitation rotative à 4 °C sur la nuit, puis centrifugés (45 min à 10000 *g*).

Afin de dessaler et concentrer les extraits protéiques, les membranes *Amicon® Ultra Centrifugal Filter Units* (Millipore), possédant un seuil de coupure de 10 kDa, sont utilisées. Pour cela, les membranes sont préalablement équilibrées avec 500 µL d'eau stérile puis centrifugées à 13000 *g* pendant 5 min. L'extrait protéique est ajouté et centrifugé 15 min à 13000 *g* à 4 °C. Trois rinçages à l'eau stérile sont ensuite effectués. Pour finir, la colonne est retournée dans un nouveau tube et l'élution est réalisée en centrifugeant 2 min à 10000 *g* à 4 °C.

Dosage protéique :

Les extraits protéiques sont dosés à l'aide de la méthode de Bradford (Bradford, 1976), en utilisant le réactif Protein assay (Bio-Rad). Cette réaction donne une couleur bleue à la solution permettant le dosage des protéines au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 595 nm (Bradford, 1976). Nos échantillons ont été dosés contre une gamme étalon allant de 0 à 20 µg de protéine réalisée à partir d'une solution mère de BSA (*Bovin Serum Albumin*) à 2 $mg.mL^{-1}$.

II. 5. b. Dosage de l'activité PME :

L'activité PME totale a été mesurée grâce à la méthode de Klavons (Klavons et Bennett, 1986). Le méthanol libéré par l'action des PMEs est oxydé par l'alcool oxydase

pour former du formaldéhyde. Cent microlitres d'échantillon sont mélangés à 1 mL d'une solution d'alcool oxydase à 1 $U.mL^{-1}$ dans du phosphate de sodium 100 mM, pH 7,5. Un millilitre d'une solution de pectines 1 % (m/v) (Sigma; DM > 85 %) est ajouté et le mélange est incubé à 25 °C pendant 15 min. La réaction de dé-méthylestérification est stoppée par ajout d'1 mL d'une solution d'acétate d'ammonium 200 mM et d'acide acétique à 50 mM. Le dosage colorimétrique est réalisé après incubation pendant 15 min à 60 °C avec 20 mM de 2,4-pentanedione qui réagit avec le formaldéhyde formé et donne un composé jaune détectable à 412 nm. Une gamme étalon de méthanol est réalisée en parallèle avec des concentrations comprises entre 0 et 25 µg.

II. 5. c. Focalisation isoélectrique et zymogramme :

Afin de séparer et visualiser l'activité spécifique des différentes isoformes de PMEs présentes dans les extraits protéiques, un zymogramme des activités PMEs est réalisé à partir d'une IEF. Avec cette méthode, seules les isoformes majoritaires présentant une activité PME importante sont observables.

La séparation par IEF est effectuée en fonction du point isoélectrique (pI) des PMEs. En effet, chaque isoforme va migrer au sein d'un gel présentant un gradient de pH, vers son état d'équilibre, qui correspond au pH égal au pI. Pour séparer les isoformes, un gel de gradient de pH 6-10,5 (Pharmalytes™ 6-10,5 pour IEF de GE Healthcare Bio-sciences AB) dans 5,8 % (m/v) acrylamide (Tableau 13) est préparé en suivant les instructions du fabricant en utilisant le système *Multiphor II* (LKB Pharmacia). Le gel préparé est coulé entre deux plaques de verre contre une membrane plastique (Gel-Bond) en contact aqueux avec la plaque de verre n°2.

Tableau 13 : Tableau des composants du gel d'IEF.

Composé	Concentration solution mère	Volume	Concentration finale
Acrylamide / Bisacrylamide	**40% (m/v) (29:1)**	**3,75 mL**	**5,8% (m/v)**
Eau milliRO		**19,79 mL**	
Ampholytes		**1,8 mL**	**1 X**
APS	**10%**	**0,15 mL**	**0,05% (m/v)**
Temed		**0,001 mL**	

Après polymérisation, le gel est démoulé et déposé sur une plaque réfrigérée à 4°C. Des bandes acides ou anodes (acide aspartique 25 mM et acide glutamique 25 mM) et basiques ou cathodes (Ethylène-diamine 2 M, Arg 25 mM et Lys 25 mM) sont disposées sur le gel. Afin d'établir un gradient de pH entre les 2 bandes, une pré-focalisation est réalisée pendant 15 min en ampérage constant à 15 mA. Le voltage et la puissance maximum étaient respectivement limités à 3000 V et 15 W. Ensuite, un bracelet de dépôt est placé dans le tiers acide du gel. La séparation des isoformes par IEF est réalisée en puissance constante à 300 V, 55 mA, 25 W pendant 50 min puis 5 min supplémentaires à 30 W.

Le gel de migration est ensuite récupéré et rincé pendant 30 min avec une solution de Tris-HCl 20 mM et EDTA 5 mM à pH 8,5, afin d'éliminer les ampholytes. Le gel est incubé une nuit en faisant un sandwich de 1 % (p/v) pectine de citron avec un DM 85 % (Sigma) et 1 % (p/v) d'agar selon Bertheau *et al.* (1984) dans un tampon (Tris-HCl 20 mM, EDTA 5 mM, NaCl 160 mM, pH 7,6). Les pectines dans le gel en contact avec les PMEs vont être dé-méthyl-estérifiées. Afin de révéler cette dé-méthylestérification, le gel est rincé à l'eau déionisée, traité avec 0.1 M d'acide malique et incubé dans une solution de rouge de ruthénium à 0,02 % durant 3 h comme proposé par Thonar et *al.* (2006). Le réactif colore les structures poly-anioniques, ce qui permet de mettre en évidence les charges négatives libérées lors de la dé-méthylestérification des HGs et visualiser l'activité PME des différentes isoformes séparées présentes au sein du gel de migration. Le gel est ensuite séché à température ambiante et photographié avec un appareil photo NOKIA sur une table visionneuse.

II. 5. d. Estimation du degré de méthyl-estérification des HGs par spectroscopie en Infra-Rouge par Transformée de Fourrier :

La spectroscopie en Infra-Rouge par Transformée de Fourrier (*Fourrier transformed infra-red spectroscopy* ou FTIR) permet d'estimer le degré de méthyl-estérification des pectines (Gnanasambandam et Proctor, 2000 ; Manrique et Lajolo, 2002 ; Gribaa *et al.,* 2013).

Les grains de pollen matures secs collectés avec un aspirateur (8 mg) et dont les débris ont été enlevés à la pince sont traités 3 fois à l'éthanol 70 % pendant 30 min à température ambiante. Des centrifugations de 10 min à 6000 *g* ont permis de concentrer

les grains de pollen entre chaque bain d'éthanol. Les grains sont ensuite broyés dans l'éthanol dans un tube Eppendorf pour obtenir l'*AIR* (*alcohol insoluble residue*). Cet AIR est ensuite centrifugé, puis traité à l'eau bouillante durant 1 h 30 min dans un bain marie sous agitation à 95°C. Après lyophilisation, les échantillons sont stockés dans une cloche à vide contenant du silica-gel afin d'éviter la réhydratation des lyophilisats.

Les fractions enrichies en pectines sont analysées avec un *OMNI-Sampler FT-IR spectroscopy* (version 5.2a) à 4 cm^{-1} de résolution. Le degré de méthyl-estérification (DM) a été calculé en utilisant les intensités de l'absorbance à 1630 et 1740 cm^{-1} correspondant aux groupes carboxyls (COO^{-}) des acides galacturoniques et aux groupements méthyl-ester, à l'aide de la formule suivante DM= A_{1740} / (A_{1740}+A_{1630}) (Gnanasambandam et Proctor, 2000 ; Manrique et Lajolo, 2002 ; Gribaa *et al.,* 2013). Les valeurs présentées sont la moyenne obtenue de 10 spectres acquis par échantillon et de 3 réplicats biologiques. Des pectines commerciales avec un DM connu ont été utilisées comme contrôles. Les DMs obtenus par cette méthode de calcul étaient : DM <85% a donné 75,1 ± 2,5% ; DM 55-70% a donné 60,5 ± 1,5% ; DM 20–30% a donné 26,9 ± 3,4% ; DM = 8,6% a donné 10,8 ± 0,9%).

II. 6. ANALYSE *IN SILICO* ET TRAITEMENTS STATISTIQUES :

Analyse phylogénétique :

Des alignements de séquences ont été réalisés grâce à l'algorithme ClustalW (Thompson *et al.,* 1994) disponible au sein du logiciel MEGA 4 (Tamura *et al.,* 2007). Les réglages utilisés sont les suivants : *Point accepted mutation* (PAM) *pairwise gap opening/extension penalties* de 10/0.1, et *multiple aligment gap opening/extension penalties* de 10/0.2. Le phylogramme est construit à partir de chaque alignement ainsi généré en utilisant la méthode du *neighbour-joining* (Saitou et Nei, 1987) afin de tenir compte des différences de vitesse d'évolution entre les différentes branches de l'arbre phylogénétique.

Statistiques :

Toutes les données ont été traitées statistiquement avec un test paramétrique pour échantillons indépendants, avec une variable de type ordinale (par le test de Student pour la comparaison de deux échantillons ou le test ANOVA pour comparaison de plus de deux échantillons) à l'aide du programme Prism (GraphPad Software Inc, USA, www.graphpad.com), avec une p value inférieure à 0,05.

III. RÉSULTATS

III. 1. ANALYSE DE L'EXPRESSION DES PMEs DANS LES GRAINS DE POLLEN ET LES TUBES POLLINIQUES SAUVAGES :

III. 1. a. Analyses bioinformatiques :

Arbre phylogénétique des PMEs :

Parmi les 66 gènes *PME*s prédits dans le génome d'*A. thaliana*, 14 semblent spécifiquement exprimés dans le gamétophyte mâle (données de Genevestigator, Hruz *et al.,* 2008 et e-FP Browser, Winter *et al.,* 2007).

La première étape de cette étude a été de compléter une partie des données de bioinformatique prédites par les banques de données, en utilisant la phylogénie. Le profilage phylogénétique est basé sur le concept que les gènes liés fonctionnellement entre eux subissent les mêmes pressions de sélection au cours de l'évolution (Pellegrini *et al.,* 1999). Pour cela, un phylogramme a été réalisé, à partir des séquences génomiques des PMEs (Figure 36), afin de vérifier si les isoformes exprimées exclusivement dans le gamétophyte mâle ont suivi la même évolution phylogénétique et se retrouvent dans un même cluster.

Le phylogramme (Figure 36), montre que les différentes isoformes de PMEs spécifiques du grain de pollen ne se retrouvent pas dans un même cluster. Ce qui signifie que leur évolution au cours du temps n'a pas été la même, et que le caractère spécifique au gamétophyte mâle ne vient pas d'une évolution commune de ces PMEs.

Parmis les 3 PMEs ubiquitaires présentées dans le phylogramme, celles codées par les gènes At3g29090 et At5g09760 sont exprimées dans tous les organes de la plantes, durant tout de développement de celle-ci, exception faite du gamétophyte mâle (se référer à la partie I. 4. e. Implication des PMEs et des PMEIs dans le remodelage des HGs lors de la croissance du tube pollinique : Figure 30 : Expression des PMEs dans l'ensemble des tissus chez *A. thaliana*.)

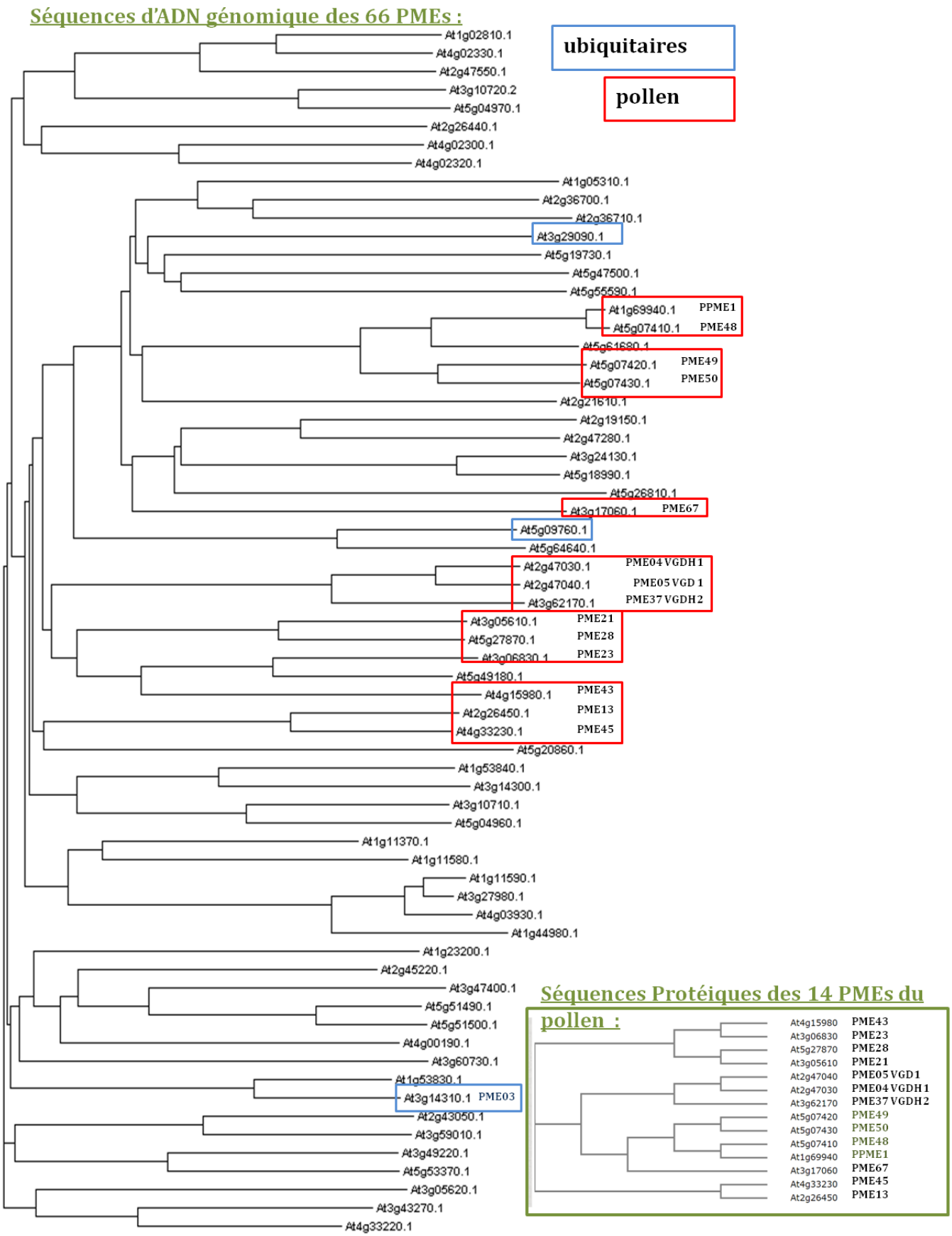


Figure 36 : Arbre phylogénétique des 66 *PMEs* d'*A. thaliana,* construit à partir des alignements des séquences d'ADN obtenus par ClustalW, et généré en utilisant la méthode du *neighbour-joining*.

Les 14 *PME*s spécifiques du pollen sont encadréesen rouge et trois ubiquitaires sont encadrées en bleu. L'encadré vert présente l'arbre phylogénétique construit à partir des alignements des séquences protéiques des 14 PMEs spécifiques du pollen. Les 4 PMEs du groupe I sont regroupées dans un même cluster (en vert).

Analyse de l'expression des *PME*s spécifiques du pollen d'après e-FP Browser :

Les données de transcriptomique semblent indiquer que les niveaux d'expression des gènes évoluent au cours de la maturation du grain de pollen. Les niveaux d'expression analysés sont les expressions absolues, normalisées par la méthode GCOS (ref Genevestigator) et provenant des puces affimetrix ATH1 récupérées depuis EFP Browser (http://www.bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi).

Les gènes les plus exprimés durant la microgamétogenèse sont les mêmes que ceux retrouvés dans les grains de pollen matures, secs et imbibés (Tableau 14). *PME4* (*VANGUARD HOMOLOGUE, VGDH1*) et *PME5* (*VANGUARD, VGD1*) (expression allant de 1888,5 dans le pollen unicellulaire à 9592,1 dans le grain de pollen mature), *PPME1* et *PME48* (expression allant de 1041,8 dans le pollen unicellulaire à 7600,7 dans le grain de pollen mature), ainsi que *PME50* (expression allant de 63,8 dans le pollen unicellulaire à 8606,5 dans le grain de pollen mature) sont les 5 gènes les plus exprimés. *PME37* est très exprimé dans le grain de pollen tricellulaire et dans les grains de pollen matures (respectivement 7934,6 et 6829,9), mais peu durant les premières étapes de la microgamétogenèse (avec 333,6 dans le pollen unicellulaire et 2380,35 dans le pollen bicellulaire).

Dans les tubes polliniques cultivés *in-vitro* durant 4 h, les gènes les plus exprimés sont *PME50* (avec 7258,6), *PME4* et *PME5* (avec 6539,65), *PME37* (avec 5546,22), *PME67* (avec 4826,6), *PPME1* et *PME48* (avec 4702,65), *PME21* (avec 4618,88), *PME13* (avec 4361,9) et *PME49* (avec 3144,6).

Les gènes les plus exprimés dans les tubes polliniques cultivés en semi *in-vivo* sont assez similaires à ceux trouvés en *in-vitro*. Ce sont dans l'ordre décroissant d'expression *PME4*, *PME5, PME50*, *PME21*, *PME13, PME37* et *PME67* (Tableau 14), suivis de *PPME1* et *PME48*.

Tableau 14 : Niveaux d'expression des 14 *PME*s spécifiques du pollen d'après les données de transcriptomique dans e-FP Browser.

		Niveau d'expression (absolue)					
		Microgamétogenèse			Grain de pollen		
Locus	ID Protéine	Uninucléaire	Pollen bicellulaire	Pollen tricellulaire	Mature	Sec	Imbibé
At1g69940	PPME1	1041,8 +/- 84,29	3013,2 +/- 425,1	7452,55 +/- 725,75	7600,70	4990,16 +/- 352,37	5098,57 +/- 334,03
At5g07410	PME48	1041,8 +/- 84,29	3013,2 +/- 425,1	7452,55 +/- 725,75	7600,70	4990,16 +/- 352,37	5098,57 +/- 334,03
At5g07420	PME49	29,05 +/- 8,55	122,05 +/- 12,14	4871,75 +/- 688,35	3511,60	3519,51 +/- 424,99	3605,88 +/- 335,76
At5g07430	PME50	63,8 +/- 8,9	298,35 +/- 28,75	6584,25 +/- 356,25	8606,50	6649,55 +/- 604,7	7181,58 +/- 375,66
At3g17060	PME67	2,45 +/- 0,25	28,1 +/- 9,79	2110,44 +/- 19,85	6694,70	4796,4 +/- 190,14	4707,4 +/- 307,04
At2g26450	PME13	9,4 +/- 5,4	55,95 +/- 0,75	2488,5 +/- 66,9	6557,50	4168,8 +/- 228,51	4391,9 +/- 198,98
At2g47030	PME04 VGDH1	1888,5 +/- 44,4	4135,8 +/- 1138,7	8670,45 +/- 1049,34	9592,10	7237,24 +/- 564,38	7074,69 +/- 174,16
At2g47040	PME05 VGD1	1888,5 +/- 44,4	4135,8 +/- 1138,7	8670,45 +/- 1049,34	9592,10	7237,24 +/- 564,38	7074,69 +/- 174,16
At3g05610	PME21	21,4 +/- 4	97,1 +/- 16,39	4890,45 +/- 531,15	7557,40	4908,39 +/- 155,82	4778,26 +/- 189,55
At3g06830	PME23	34,5 +/- 9,5	93 +/- 20	2191,75 +/- 209,25	4485,10	2031,06 +/- 99,61	1952,02 +/- 105,7
At3g62170	PME37	333,6 +/- 6,59	2380,35 +/- 291,75	7934,6 +/- 1270,9	6829,90	5560,57 +/- 124,04	5434,58 +/- 132,96
At4g15980	PME43	36,25 +/- 3,14	39,59 +/- 3,19	714,9 +/- 18,5	1930,80	1032,3 +/- 72,54	905,89 +/- 52,31
At4g33230	PME45	9 +/- 4,3	8,94 +/- 5,65	278,05 +/- 15,25	839,40	759,85 +/- 58,41	904,55 +/- 90,04
At5g27870	PME28	9,8 +/- 6,3	33,1 +/- 3	1117,15 +/- 436,85	1626,60	2859,66 +/- 201,25	2817,71 +/- 241,38

		Niveau d'expression (absolue)			
		tubes polliniques		Pistil	
Locus	ID Protéine	*in-vitro* 4 heures	semi *in-vivo*	stigmate	ovaire
At1g69940	PPME1	4702,65 +/- 481,89	3209,37 +/- 282,29	30,35 +/- 7,24	46,91 +/- 27,98
At5g07410	PME48	4702,65 +/- 481,89	3209,37 +/- 282,29	30,35 +/- 7,24	46,91 +/- 27,98
At5g07420	PME49	3144,6 +/- 766,18	132,39 +/- 27,22	30,35 +/- 7,24	46,91 +/- 27,98
At5g07430	PME50	7258,62 +/- 569,54	7198,72 +/- 559,06	90,31 +/- 3,68	44,95 +/- 11,67
At3g17060	PME67	4826,6 +/- 354,34	4838,3 +/- 109,4	5,06 +/- 4,03	3,61 +/- 0,53
At2g26450	PME13	4361,9 +/- 199,35	4954,5 +/- 293,98	34,23 +/- 9,08	14,8 +/- 8,64
At2g47030	PME04 VGDH1	6539,6 +/- 620,01	7813,1 +/- 192,37	164,06 +/- 10,61	47,5 +/- 37,87
At2g47040	PME05 VGD1	6539,65 +/- 620,01	7813,07 +/- 192,37	164,06 +/- 10,61	47,5 +/- 37,87
At3g05610	PME21	4618,88 +/- 244,35	5347,8 +/- 224,83	30,05 +/- 9,14	15,14 +/- 10,49
At3g06830	PME23	1593,54 +/- 362,56	73,58 +/- 17,5	25,42 +/- 3,43	34,98 +/- 2,93
At3g62170	PME37	5566,42 +/- 280,34	4940,8 +/- 868,02	40,57 +/- 6,26	33,99 +/- 15,2
At4g15980	PME43	592,5 +/- 156,18	46,49 +/- 5,75	28,56 +/- 2,95	51,51 +/- 8,85
At4g33230	PME45	917,71 +/- 84,05	92,93 +/- 10,38	14,61 +/- 9,08	27,34 +/- 7,17
At5g27870	PME28	2537,82 +/- 235,46	66,61 +/- 5,55	7,24 +/- 4,79	19,35 +/- 6,96

Quatre *PMEs* présentent des caractéristiques intéressantes. En effet, les données de microarray ne permettent pas de distinguer une différence du niveau d'expression entre *PPME1* et *PME48* (Tableau 14. encadré rouge) ni entre *PME4* et *PME5* (Tableau 14. encadré jaune). Du fait de la similarité des niveaux d'expression des deux gènes *PPME1* et *PME48*, nous nous sommes intéressés dans un premier temps à comparer leurs séquences nucléotidiques. Ainsi, un alignement des séquences des ADNc de *PPME1* et *PME48* montre qu'ils partagent 95 % de leurs acides nucléiques (Annexe 1 A, Figure 69 A). Les deux gènes possèdent chacun 5 exons de tailles identiques à savoir, 204, 276, 207, 239 et 160 pb (Figure 37).

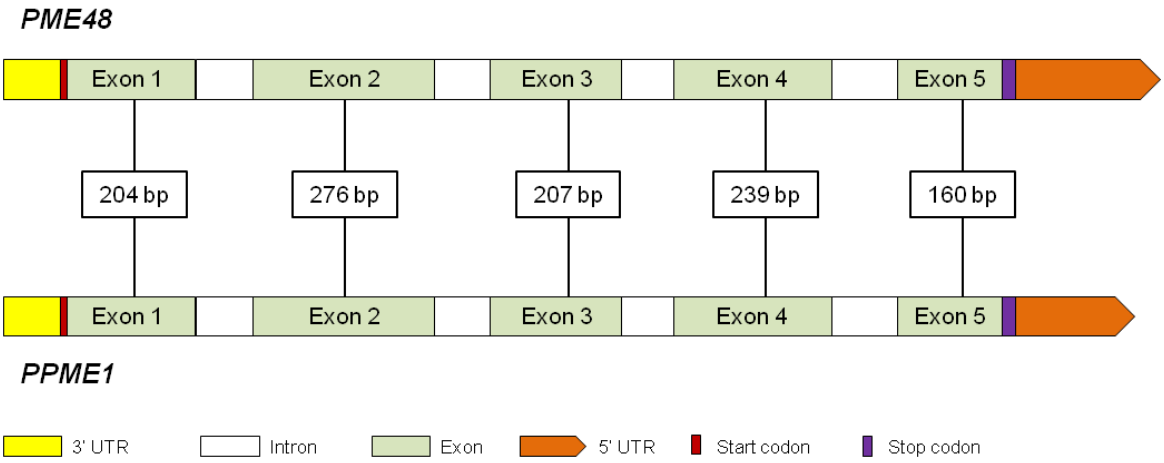


Figure 37 : Représentation schématique des séquences génomiques de *PME48* et *PPME1*.

En revanche, les parties non traduites (UTR), en 3' (promoteur) et en 5' sont très différentes (Seulement 45 % de similarité pour les régions 5'UTR alignées *via* ClustalW2, se référé à l'Annexe 1). L'expression de ces gènes pourrait donc être très différente, bien que non observée sur les puces Affimetrix ATH1. De même, l'alignement des séquences en acides aminés (AA) de PPME1 et PME48 indique que ces deux protéines partagent 97 % de leurs AA (BlastP, Figure 38).

Les deux protéines possèdent 361 AA et seulement 12 AA différents. Sept d'entre eux, même s'ils ne sont pas identiques, présentent les mêmes caractéristiques biochimiques (Figure 38). Par exemple, l'AA 19 est une thréonine (Thr, T) chez la PPME1 et une sérine (Ser, S) chez la PME48, or ces deux AA portent une fonction alcool. Donc, ces deux séquences présentent 99 % d'AA de même nature biochimique. Cinq AA diffèrent au niveau du peptide de signalisation, dont 4 gardent les mêmes propriétés biochimiques (+). Au niveau des domaines catalytiques, seuls 2 AA diffèrent, en 101ème et en 343ème position. PPME1 possède une proline (Pro, P) et une arginine (Arg, R) tandis que PME48 une histidine (His, H) et une cystéine (Cys, C).

```
PPME1   1    MGYTNVSILLGLLMVFVTPMVFADDVTPIPEGKPQVAQWFNANVGPLAQRKGLDPALVAA  60
PME48   1    MRYTNVSILLGMLVIFVSPMVFADDLTPIPEGKPQVVQWFNTHVGPLAQRKGLDPALVAA  60
             M YTNVSILLG+L++FV+PMVFADD+TPIPEGKPQV QWFN +VGPLAQRKGLDPALVAA

PPME1   61   EAAPRIINVNPKGGEFKTLTDAIKSVPAGNTKRVIIKMAPGEYKEKVTIDRNKPFITLMG  120
PME48   61   EAAPRIINVNPKGGEFKTLTDAIKSVPAGNTKRVIIKMAHGEYREKVTIDRNKPFITLMG  120
             EAAPRIINVNPKGGEFKTLTDAIKSVPAGNTKRVIIKMA GEY+EKVTIDRNKPFITLMG

PPME1   121  QPNAMPVITYDGTAAKYGTVDSASLIILSDYFMAVNIVVKNTAPAPDGKTKGAQALSMRI  180
PME48   121  QPNAMPVITYDGTAAKYGTVDSASLIILSDYFMAVNIVVKNTAPAPDGKTKGAQALSMRI  180
             QPNAMPVITYDGTAAKYGTVDSASLIILSDYFMAVNIVVKNTAPAPDGKTKGAQALSMRI

PPME1   181  SGNFAAFYNCKFYGFQDTICDDTGNHFFKDCYVEGTFDFIFGSGTSMYLGTQLHVVGDGI  240
PME48   181  SGNFAAFYNCKFYGFQDTICDDTGNHFFKDCYVEGTFDFIFGSGTSMYLGTQLHVVGDGI  240
             SGNFAAFYNCKFYGFQDTICDDTGNHFFKDCYVEGTFDFIFGSGTSMYLGTQLHVVGDGI

PPME1   241  RVIAAHAGKSAEEKSGYSFVHCKVTGTGGGIYLGRAWMSHPKVVYAYTEMTSVVNPTGWQ  300
PME48   241  RVIAAHAGKSAEEKSGYSFVHCKVTGTGGGIYLGRAWMSHPKVVYAYTEMTSVVNPTGWQ  300
             RVIAAHAGKSAEEKSGYSFVHCKVTGTGGGIYLGRAWMSHPKVVYAYTEMTSVVNPTGWQ

PPME1   301  ENKTPAHDKTVFYGEYKCSGPGSHKAKRVPFTQDIDDKEANRFLSLGYIQGSKWLLPPPA  360
PME48   301  ENKTPAHDKTVFYGEYKCSGPGSHKAKRVPFTQDIDDKEANCFLSLGYIQGSKWLLPPPA  360
             ENKTPAHDKTVFYGEYKCSGPGSHKAKRVPFTQDIDDKEAN FLSLGYIQGSKWLLPPPA

PPME1   361  L  361
PME48   361  L  361
             L
```

Figure 38 : Alignement des séquences en acides aminés de PPME1 et PME48.
Les protéines issues de l'expression des gènes *PPME1* et *PME48* possèdent 97% d'AA identiques (en rouge) et 99% d'AA similaires (de même nature biochimique ; + rouge). Valeurs obtenues avec BLASTp. Cinq AA diffèrent dans le peptide signal (surligné en jaune), dont 4 restent similaires (+ rouge). Dans les domaines catalytiques (surlignés en vert), seuls 2 AA diffèrent, en 101ème position et en 343ème position.

Cette grande homologie a conduit parfois à une erreur d'étiquetage avec At5g07410 se référant à *PPME1* (Ge *et al.,* 2011). De même, lors des études du mutant *ppme1* (Tian *et al.,* 2006), les amorces utilisées (amorces LP 5'-CCGGCACCAGATGGTAAAACT-3' et RP 5'-TGGATGTAGCCGAGGGATAGG-3) pour sélectionner le mutant *ppme1* s'hybrident aussi sur les ADNc de *PME48*. Elles permettent d'obtenir la même taille d'amplification par PCR (soit 559 paires de bases, cf. Annexe 1a, Figure 69 A). L'étude de Tian et collaborateurs ne permet donc pas de distinguer *PPME1* de *PME48*. Le second couple de gènes dont les niveaux d'expressions sont similaires (At2g47040 et At2g47030, codant respectivement pour PME4 (VGD1) et PME5 (VGDH1) (Jiang *et al.* 2005).

III. 1. b. Analyse des niveaux d'expression des *PMEs* par RT-qPCR :

Afin de connaître plus précisément les niveaux d'expression des 14 gènes *PME*s spécifiques du pollen, une étude par PCR quantitative en temps réel a été entreprise sur les ADNc de pollen sauvage en collaboration avec le laboratoire BioPi (Université Picardie Jules Verne à Amiens).

Après validation de la spécificité des amorces pour chaque *PME* (amorces présentées dans le Tableau 11 (*cf*. II. 3. e. Étude de l'expression des gènes par qRT-PCR : l'expression des 14 gènes a été analysée dans des grains de pollen secs et imbibés pendant 1 h dans un milieu liquide ainsi que dans des tubes polliniques âgés de 6 h (Figure 39). On observe que l'expression des *PME*s spécifiques du pollen évolue au cours de l'imbibition et de la germination. Certains sont fortement exprimés dans les trois échantillons testés, comme *PME5*, *PME48*, *PME4* et *PME50*, tandis que d'autres sont très faiblement exprimés comme *PME23*, *PME43, PME45* et *PME28*.

Sur les 14 gènes, 4 sont fortement exprimés dans les grains de pollen secs : *PME4* (*VGDH1*), *PME5* (*VGD1*), *PME37* et *PME48* (Figure 39 A). Au cours de l'imbibition et dans les tubes polliniques cultivés *in-vitro*, *PME4*, *PME5*, *PME50* ainsi que *PME48* sont fortement exprimés par rapport aux 10 autres *PME*s (Figure 39 B et C). PME48 et PME50 appartiennent aux PMEs du groupe I, tandis que les PME4 et PME5 (Jiang *et al.,* 2005) appartiennent au groupe II.

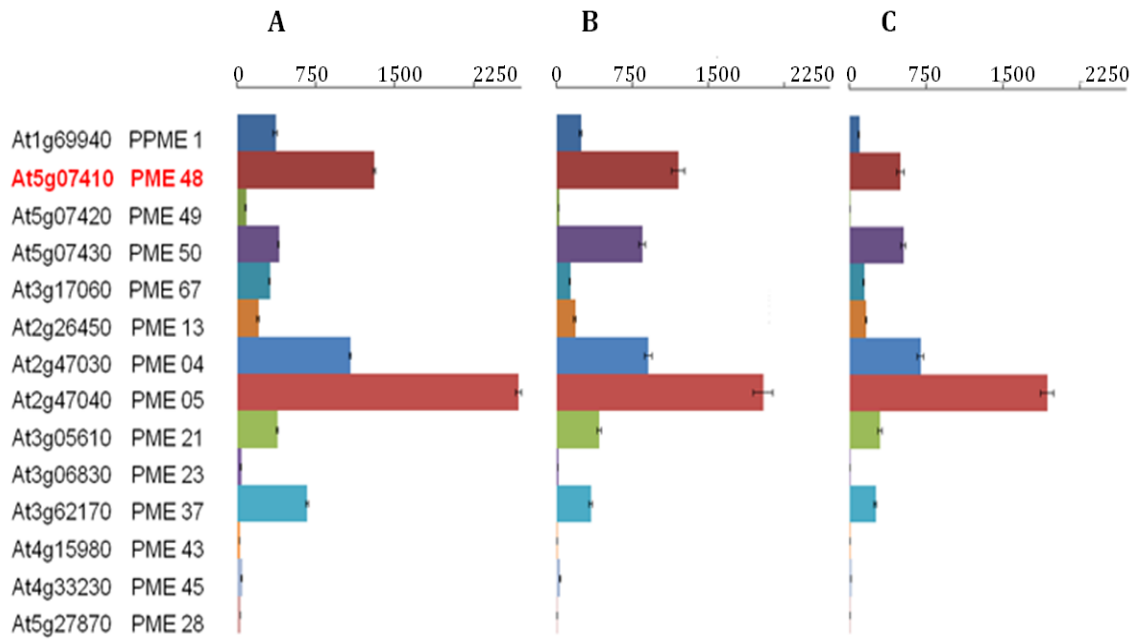


Figure 39 : Analyse des niveaux d'expression des transcrits des *PME*s spécifiques du pollen par RT-qPCR dans des grains de pollen secs (A), après une heure d'imbibition (B) et dans des tubes polliniques cultivés pendant 6 h en MGL (C).
Le locus et le nom des protéines sont indiqués. Une quantité égale d'ADNc a été utilisée pour les réactions de PCR.

Lorsque l'on compare ces résultats de RT-qPCR (Figure 39) avec les données de transcriptomique (Tableau 14), on observe à la fois des similarités mais aussi des différences très importantes.

Dans les 2 analyses, *PME4* et *PME5* sont les deux gènes les plus exprimés dans le pollen mature sec, imbibé et dans les tubes polliniques. *PME37* et *PME50* ont aussi un niveau d'expression assez élevé. Par contre, pour les 2 gènes *PPME1* et *PME48* non discriminés par les analyses de microarray, il apparaît que *PME48* soit nettement plus exprimé. Sur les 14 *PMEs*, *PME48* est le deuxième gène le plus exprimé après *PME5* dans les grains secs et imbibés.

III. 1. c. Cinétique d'expression des promoteurs :

Analyse de l'expression de *PRO*$_{PPME1}$, *PRO*$_{PME48}$ et *PRO*$_{PME23}$ avec le gène rapporteur *GUS* :

Afin de vérifier si les gènes *PPME1*, *PME48* et *PME23* sont uniquement exprimés dans le pollen, l'activité des promoteurs de *PME48*, *PPME1* et *PME23* a été analysée en utilisant une construction possédant le gène rapporteur *GUS*.

Dans les trois cas, l'activité *GUS* est détectée dans les grains de pollen secs (Figure 40 A, C-E et G), dans les tubes polliniques cultivés *in-vitro* (Figure 40 B, F, G encadré) et *in-vivo* (Figure 40 C, E, G).

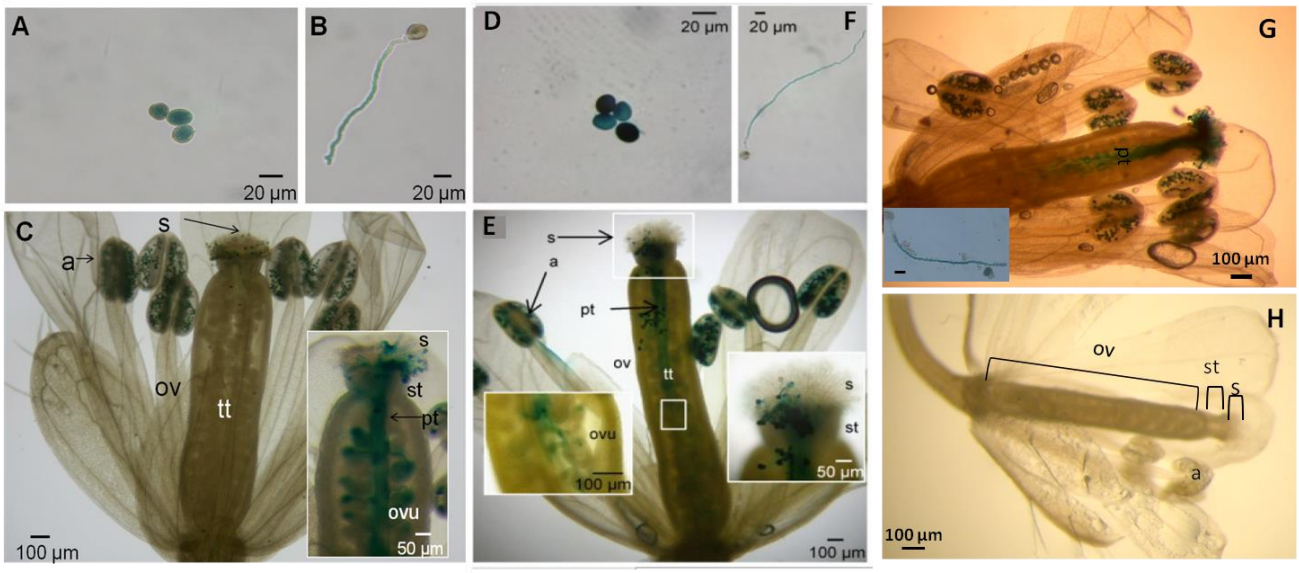


Figure 40 : Analyse de l'expression des promoteurs de PME48 (A, B, C), PPME1 (D, E, F) et PME23 (G).
La présence de l'activité GUS contrôlée par les promoteurs *PRO*$_{PME48}$, *PRO*$_{PPME1}$ et *PRO*$_{PME23}$ a été détectée par coloration au X-Gluc sur des grains de pollen secs (A, D), sur des tubes polliniques cultivés *in-vitro* pendant 6 h (B, F, G insert) et *in-vivo* dans les grains de pollen et les tubes polliniques (C, E, G). H, Absence de l'activité *GUS* dans les organes floraux sauvages (WT) *in-vivo*. a, anthères ; ov, ovaires ; ovu, ovules ; pt, tube pollinique ; s, stigmate ; st, style; tt, tissu de transmission. Barres d'échelles : A, B, D, F : 20 µm ; C, E, G, H : 100 µm ; C encadré, E encadré, G encadré : 50 µm.

In-vivo, on peut observer les grains de pollen localisés dans les anthères, les grains de pollen germés déposés sur le stigmate et dans les tubes polliniques ayant grandi dans le tissu de transmission. Par contre, les promoteurs ne sont ni exprimés dans les organes floraux diploïdes (anthère, filet, pétale et pistil) (Figure 40 C-E et G) ni

dans les organes végétatifs (non montré). Cette coloration GUS n'a jamais été observée dans les organes végétatifs et floraux des plantes sauvages (Figure 40 H).

Analyse de l'expression du *PRO$_{PME48}$* avec le gène *sYFP* :

Pour la création de la lignée PRO$_{PME48}$:*sYFP*, se référer à l'Annexe 4.

Le suivi de l'expression à l'aide de la construction *PRO$_{PME48}$:*sYFP permet, à l'inverse de la coloration GUS, de travailler sur du matériel vivant et donc de suivre, *in-vitro*, en « time lapse imaging » l'expression du promoteur de la PME48. Ce suivi est réalisé par microscopie confocale à balayage laser. La fluorescence de la sYFP dans les grains de pollen secs, imbibés pendant une heure et dans les tubes polliniques est localisée dans le noyau de la cellule végétative grâce à la séquence NLS$_{SV40}$ présente dans le plasmide. Ceci permet de concentrer le signal (Figure 41). Le signal fluorescent est présent dans des grains de pollen secs, les grains de pollen imbibés et également dans les tubes polliniques en croissance (Figure 41). Ces résultats sont donc cohérents avec ceux obtenus avec la construction *PRO$_{PME48}$:GUS*.

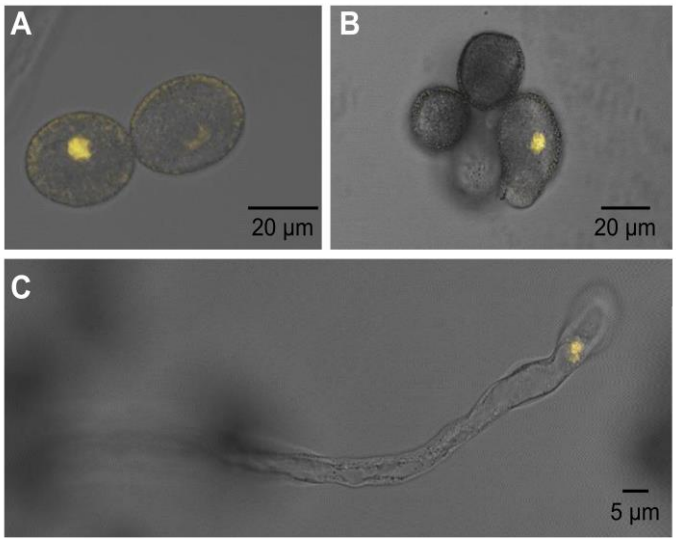


Figure 41 : Analyse de l'expression du promoteur *PRO$_{PME48}$*.
Les grains de pollen et les tubes polliniques de la lignée exprimant la construction *PRO$_{PME48}$:sYFP* sont observés sous microscope confocal à balayage laser. A. Grains de pollen juste incubés dans le MGL, B. Grains de pollen imbibés durant 1 h dans du MGL, C. Tube pollinique âgé de 6 h. Barres déchelles : A, B : 20 µm ; C : 5 µm.

III. 2. SÉLECTION DES LIGNEES MUTANTES HOMOZYGOTES PAR PCR/RT-PCR :

Pour comprendre le rôle de certaines PMEs exprimées spécifiquement dans le pollen, nous avons sélectionné plusieurs lignées mutantes. Pour le mutant *pme48*, deux types d'insertions étaient disponibles dans les banques de mutants : SALK_122970 (nommé *pme48-1*) et SALK_007330 (nommé *pme48-2*). Pour les mutants *ppme1* et *pme23-1*, une seule lignée a été analysée.

Le criblage génétique des mutants *pme* a été réalisé par PCR avec des amorces flanquant l'insertion de l'ADN-T dans les gènes cibles : *PME48* (nommés PME48_RP et PME48_FP pour Right et Left Primer), *PPME1* (nommés PPME1_RP et PPME1_FP pour Right et Left Primer) et *PME23* (nommés PME23-1_RP et PME23-1_FP pour Right et Left Primer) et une amorce interne à cet ADN-T (nommé LBb1.3). Les amorces spécifiques sont présentées dans la partie II. 3. d. Sélection des lignées homozygotes mutantes :. Après extraction et réplication de l'ADN génomique (ADNg) avec les amorces spécifiques de l'insert et/ou du gène codant la PME, les produits de ces PCR ont été analysés sur gel. Ce travail a ensuite été complété par une extraction des ARN messagers des tubes polliniques provenant des mutants homozygotes afin de vérifier par RT-PCR l'absence des transcrits d'intérêt.

III. 2. a. Criblage génétique des mutants *pme48-1 et pme48-2* :

La localisation de l'ADN-T chez les deux lignées mutantes *pme48-1* et *pme48-2* est montrée dans les Figures 42 et 43.

Le témoin positif avec de l'ADNg de plante WT permet d'affirmer que les amorces fonctionnent correctement (Figure 44). En effet, les tailles d'amplification avec l'ADNg sauvage et les amorces spécifiques pour le gène *PME48* correspondent aux tailles attendues. Elles sont de 315 pb pour *pme48-1* et de 526 pb pour *pme48-2* (c.f. II. 3. d. Sélection des lignées homozygotes mutantes : Tableau 5). Le témoin négatif avec de l'eau stérile indique qu'il n'y avait pas de contamination (non présenté). L'absence d'amplification pour l'ADNg des mutants *pme48-1* avec les amorces PME48-FP et PME48-RP et avec les amorces PME48-2_FP et PME48-2_RP pour *pme48-2* suppose que ceux-ci possèdent l'insert (Figure 42 et Figure 43).

Ceci est confirmé par la présence d'ADN amplifié avec l'amorce LBb1.3 spécifique de l'insert avec les tailles attendues : pour *pme48-1*, la taille attendue de l'amplification est de 402 pb, et pour *pme48-2* de 289 pb. Les lignées *pme48-1 et pme48-2* sont donc homozygotes.

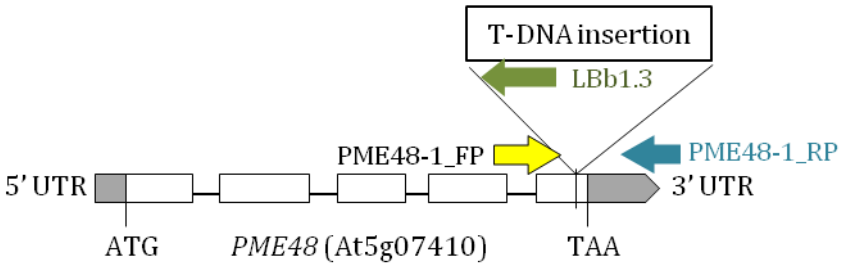


Figure 42 : Schéma représentant le gène *PME48* avec la position de l'insertion d'ADN-T pour le mutant *pme48-1* (SALK_122970) ainsi que la position des amorces utilisées.
Rectangle gris Régions non traduites, Rectangle blanc : exon, trait noir : intron

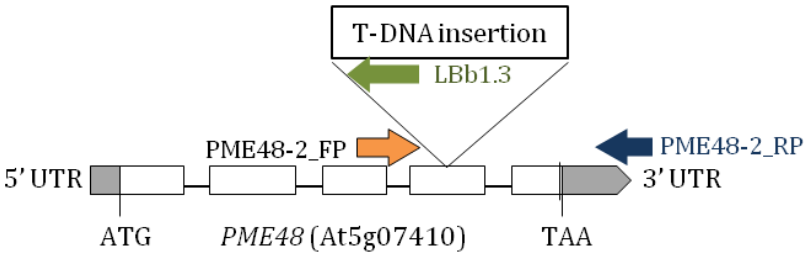


Figure 43 : Schéma représentant le gène *PME48* avec la position de l'insertion d'ADN-T pour le mutant *pme48-2* (SALK_007330) ainsi que la position des amorces utilisées.
Rectangle gris Région non traduite, rectangle blanc : exon, trait noir : intron

L'analyse par RT-PCR sur des ARNm des tubes polliniques provenant des lignées homozygotes *pme48-1* et sauvages a ensuite été réalisée. Les ADNc issus de l'extraction des ARNm des tubes polliniques sauvages ont été amplifiés par PCR avec les couples d'amorces spécifiques. La taille attendue sur l'ADNc sauvage est de 473 pb avec les amorces RP/FP pour le gène *PME48* (c.f. II. 3. d. Sélection des lignées homozygotes mutantes : Tableau 5). Le gène *PME48* est exprimé dans les tubes polliniques de plantes sauvages (Figure 44). Par contre, la transcription du gène *PME48* n'est pas détectable par RT-PCR chez *pme48-1* (Figure 44), ce qui semblerait indiqué que la lignée est *knock-out* (KO).

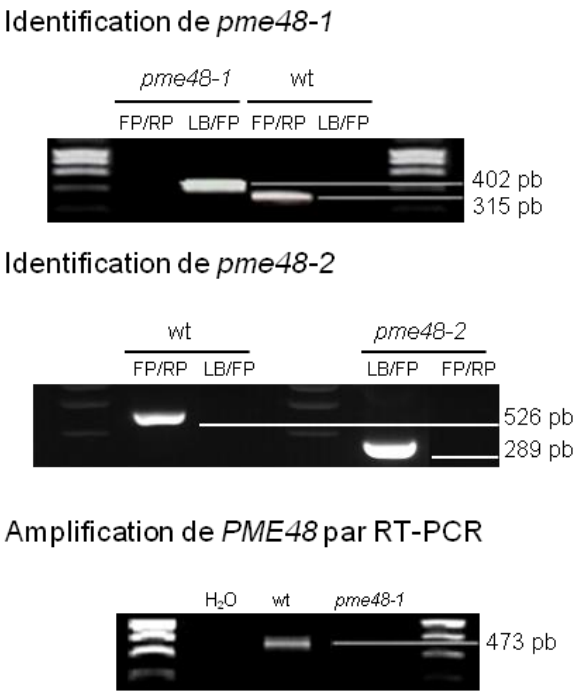


Figure 44 : Identification de *pme48-1* et *pme48-2* par migration des produits PCR et vérification de l'expression des transcrits chez *pme48-1* par RT-PCR.

III. 2. b. Criblage génétique de *ppme1 :*

Les mêmes expériences ont été réalisées pour le gène homologue de *PME48* : *PPME1* et le mutant *ppme1* (Figure 45) a été sélectionné comme présenté dans la Figure 46.

Le témoin positif avec de l'ADNg de plante WT permet d'affirmer que les amorces fonctionnent correctement (Figure 46). La taille attendue de l'amplification avec le couple d'amorce PPME1_RP et PPME1_FP est de 669 pb avec de l'ADNg WT. Un second couple d'amorce composé de PPME1_RP et de LBb1.3 permet une amplification d'un fragment à la taille attendue de 474 pb avec de l'ADNg isolé d'une plante homozygote *ppme1* (c.f. II. 3. d. Sélection des lignées homozygotes mutantes : Tableau 5). Le témoin négatif avec de l'eau stérile indique qu'il n'y avait pas de contamination (non présenté). L'absence d'amplification pour l'ADNg des mutants *ppme1* avec les amorces PPME1_FP et PPME1_RP indique que ceux-ci possèdent bien l'insert (Figure 45). La lignée mutante *ppme1* est homozygote pour la mutation.

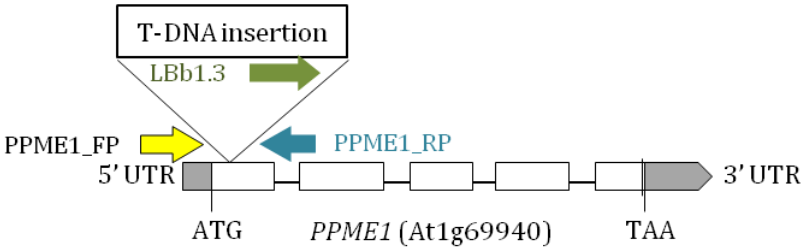


Figure 45 : Schéma représentant le gène *PPME1* avec la position de l'insertion d'ADN-T pour le mutant *ppme1* ainsi que la position des amorces utilisées.
Rectangle gris : Région non traduite, rectangle blanc : exon, trait noir : intron

L'analyse par RT-PCR révèle une bande attendue à 384 pb sur l'ADNc sauvage avec les amorces RP/FP pour le gène *PPME1* (c.f. II. 3. d. Sélection des lignées homozygotes mutantes : Tableau 5). La transcription du gène *PPME1* est détectable par RT-PCR chez *pme48-1*, mais bien absente chez *ppme1* (Figure 46).

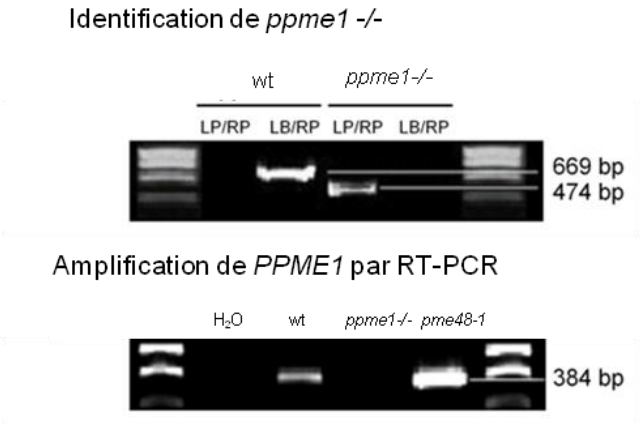


Figure 46 : Identification du mutant *ppme1* par PCR sur ADNg et vérification par RT-PCR.

III. 2. c. Criblage génétique de *pme23-1* :

Le positionnement de l'ADN-T dans le gène *PME23* est indiqué sur la Figure 47. L'absence d'amplification pour l'ADNg des mutants *pme23-1* avec les amorces PME23-1_FP et PME23-1_RP indique la présence de l'insert (Figure 47). La taille attendue de l'amplification avec le couple d'amorces PME23-1_RP et PME23-1_FP est de 455 pb avec de l'ADNg WT (c.f. c.f. II. 3. d. Sélection des lignées homozygotes mutantes : Tableau 5 ; Figure 48).

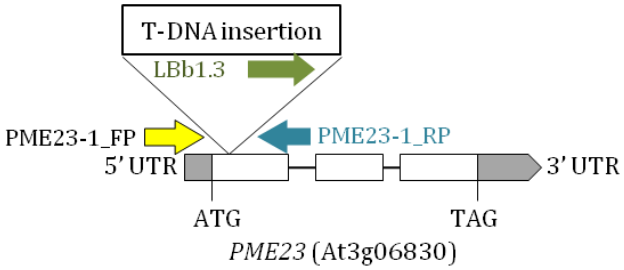


Figure 47 : Schéma représentant le gène *PME23* avec la position de l'insertion d'ADN-T pour le mutant *pme23-1* ainsi que la position des amorces utilisées.
Rectangle gris : Région non traduite, rectangle blanc : exon, trait noir : intron.

En effet, le second couple d'amorces composé de PME23-1_RP et de LBb1.3 a permis l'amplification d'un fragment de 647 pb, taille attendue avec de l'ADNg extrait d'une plante *pme23-1* (Figure 48). La lignée mutante *pme23-1* est donc aussi une lignée homozygote.

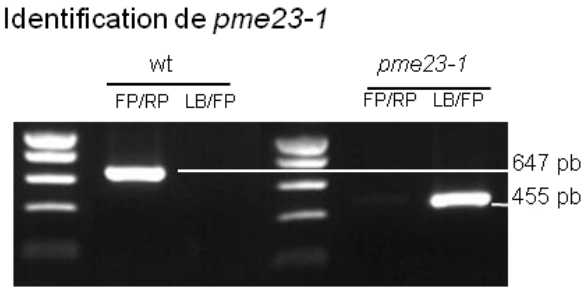


Figure 48 : Identification du mutant *pme23-1* par PCR sur ADNg.

III. 3. CARACTERISATION DU MUTANT HOMOZYGOTE *pme48-1* :

L'analyse des mutants *pme48-1* et *pme48-2* a permis de préciser le rôle de la PME48 au cours de la germination du grain de pollen d'*A. thaliana*. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication scientifique dans Plant Physiology en 2015. Dans cet article le mutant *pme48-1* est noté *pme48-/-*.

III. 3. a. Analyses phénotypiques et biochimiques du mutant homozygote *pme48-1* :

Dans cet article, une analyse phénotypique comparative des grains de pollen et des tubes pollniques sauvages et *pme48-1* cultivés *in-vitro* et *in-vivo* a été entreprise. Elle a mis en évidence un retard et un défaut de germination des grains de pollen mutants, surtout lorsque ceux-ci étaient cultivés sur MGS. Ces analyses phénotypiques ont été associées à des approches d'immunocytochimie et de biochimie permettant de montrer que l'activité PME était réduite chez le mutant et que le DM des HGs était plus élevé. Le phénotype chez le mutant pouvait être restauré en ajoutant au MGS, 2,5 mM de $CaCl_2$.

Les résultats obtenus ont permis la présentation d'un modèle hypothétique de l'implication de PME48 et du calcium lors de l'imbibition et de la germination du grain de pollen et de l'émergence du tube pollinique chez *A. thaliana*.

PECTIN METHYLESTERASE48 Is Involved in Arabidopsis Pollen Grain Germination[1][OPEN]

Christelle Leroux, Sophie Bouton, Marie-Christine Kiefer-Meyer, Tohnyui Ndinyanka Fabrice, Alain Mareck, Stéphanie Guénin, Françoise Fournet, Christoph Ringli, Jérôme Pelloux, Azeddine Driouich, Patrice Lerouge, Arnaud Lehner[2], and Jean-Claude Mollet[2]*

Laboratoire Glycobiologie et Matrice Extracellulaire, Normandie Université, Institute for Research and Innovation in Biomedicine, Végétal, Agronomie, Sol, et Innovation, 76821 Mont-Saint-Aignan, France (C.L., M.-C.K.-M., A.M., A.D., P.L., A.L., J.-C.M.); Unité Biologie des Plantes et Innovation (S.B., S.G., F.F., J.P.) and Centre de Ressources Régionales en Biologie Moléculaire (S.G.), Université de Picardie Jules Verne, 80039 Amiens, France; and Institute of Plant Biology, University of Zürich, 8008 Zurich, Switzerland (T.N.F., C.R.)

Germination of pollen grains is a crucial step in plant reproduction. However, the molecular mechanisms involved remain unclear. We investigated the role of PECTIN METHYLESTERASE48 (PME48), an enzyme implicated in the remodeling of pectins in Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) pollen. A combination of functional genomics, gene expression, in vivo and in vitro pollen germination, immunolabeling, and biochemical analyses was used on wild-type and *Atpme48* mutant plants. We showed that *AtPME48* is specifically expressed in the male gametophyte and is the second most expressed *PME* in dry and imbibed pollen grains. Pollen grains from homozygous mutant lines displayed a significant delay in imbibition and germination in vitro and in vivo. Moreover, numerous pollen grains showed two tips emerging instead of one in the wild type. Immunolabeling and Fourier transform infrared analyses showed that the degree of methylesterification of the homogalacturonan was higher in *pme48−/−* pollen grains. In contrast, the PME activity was lower in *pme48−/−*, partly due to a reduction of PME48 activity revealed by zymogram. Interestingly, the wild-type phenotype was restored in *pme48−/−* with the optimum germination medium supplemented with 2.5 mM calcium chloride, suggesting that in the wild-type pollen, the weakly methylesterified homogalacturonan is a source of Ca^{2+} necessary for pollen germination. Although pollen-specific PMEs are traditionally associated with pollen tube elongation, this study provides strong evidence that PME48 impacts the mechanical properties of the intine wall during maturation of the pollen grain, which, in turn, influences pollen grain germination.

Sexual plant reproduction requires the growth of tip-polarized pollen tubes through the female tissues in order to deliver the two sperm cells to the embryo sac. Despite the importance of this crucial step that leads to seed production, the molecular mechanisms implicated in the spatial and temporal controls of pollen tube growth are not fully known (Johnson and Lord, 2006; Palanivelu and Tsukamoto, 2012). However, it has been proposed that the modulation of the stiffness of the pollen tube was important during pollen tube growth (Parre and Geitmann, 2005a; Fayant et al., 2010; Vogler et al., 2013). Pollen tube elongation is highly polarized, with the growth area being restricted to the apex of the tube. New membranes and cell wall materials are rapidly secreted at the tip, providing the building material necessary to sustain the fast pollen tube growth (Bove et al., 2008; Guan et al., 2013). The pollen tube cell wall of many species, including tobacco (*Nicotiana tabacum*; Li et al., 1995; Ferguson et al., 1998), lily (*Lilium longiflorum*; Roy et al., 1997), and Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*; Lennon and Lord, 2000; Dardelle et al., 2010), is characterized by one layer in the tip region and two distinguishable layers back in the shank. Back from the tip, the inner layer is mainly composed of callose, a (1,3)-β-glucan, which is not detectable in the tip region in normal growth conditions (Ferguson et al., 1998; Derksen et al., 2002; Parre and Geitmann, 2005b; Dardelle et al., 2010; Chebli et al., 2012). Moreover, callose is also deposited periodically within the pollen tube to form plugs that maintain the tube cell in the expanding apical region. The outer cell wall in the tip and back from the tip is mostly composed of pectins, xyloglucan, cellulose, and proteoglycans such as arabinogalactan proteins (Geitmann and Steer, 2006; Dardelle et al., 2010; Chebli et al., 2012; Nguema-Ona et al., 2012).

In eudicot species, pectins constitute a major portion of the primary cell wall. Pectins are complex polysaccharides consisting of homogalacturonan (HG), rhamnogalacturonan I,

[1] This work was supported by the Institute for Research and Innovation in Biomedicine of the region Haute-Normandie, France (to C.L.), by the University of Rouen, and by the Trans Channel Wallnet project that was selected by the INTERREG IVA program, France (Channel)-England European cross-border cooperation program, financed by the European Regional Development Fund.

[2] These authors contributed equally to the article.

* Address correspondence to jean-claude.mollet@univ-rouen.fr.

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (www.plantphysiol.org) is: Jean-Claude Mollet (jean-claude.mollet@univ-rouen.fr).

[OPEN] Articles can be viewed without a subscription.

www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.114.250928

Downloaded from www.plantphysiol.org on January 27, 2015 - Published by www.plant.org
Copyright © 2015 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

rhamnogalacturonan II, and xylogalacturonan (Vincken et al., 2003; Dardelle et al., 2010; Fry, 2011; Dumont et al., 2014). HG is a polymer consisting of repeating units of (1,4)-α-D-galacturonic acid (GalUA) that is synthesized in the Golgi apparatus and may be deposited in the cell wall in a highly methylesterified form (Zhang and Staehelin, 1992).

Immunolabeling of HG on Arabidopsis pollen tubes showed a dominant localization of the highly methylesterified HG in the tip and of partially methylesterified HG behind the tip region (Dardelle et al., 2010; Chebli et al., 2012). This labeling pattern is also observed in pollen tubes from plants possessing a solid style, such as species in the Solanaceae (potato [*Solanum tuberosum*], tobacco, and petunia [*Petunia hybrida*]), the Oleaceae (jasmine [*Jasmium* spp.]), and the Poaceae (maize [*Zea mays*]; Li et al., 1994; Qin et al., 2007; for review, see Mollet et al., 2013), and those with a hollow style, such as lily (Jauh and Lord, 1996). The methylesterified HG in the apical dome of the pollen tube is thought to provide sufficient plasticity of the cell wall to sustain pollen tube growth (Chebli and Geitmann, 2007). In the subapical region, methylesterified HG is processed by pectin methylesterases (PMEs). Two modes of action have been described for PMEs (Micheli, 2001). If PMEs remove contiguous methylester groups, the mode of action is named the block-wise mode of action. In that case, demethylesterified HG can form ionic bonds between the negatively charged carboxyl groups of several HG chains and Ca^{2+} ions, forming a pectate gel that may provide sufficient stiffness to the pollen tube cell wall (Micheli, 2001; Geitmann and Steer, 2006; Chebli et al., 2012). Alternatively, the partial removal of noncontiguous methylester groups by PMEs, which is named the random mode of action, may allow pectin-degrading enzymes (such as polygalacturonases [PGases] and pectate lyases [PLs]) to cleave the HG backbone, thus affecting the rigidity of the cell wall (Micheli, 2001; Bosch and Hepler, 2005; Parre and Geitmann, 2005a; Sénéchal et al., 2014). Therefore, the fine control of the modulation of the degree of methylesterification (DM) of the HG by PMEs is of main importance (Wolf et al., 2009a) in the pollen tube growth dynamics. The Arabidopsis genome contains 66 putative PMEs. Most of them display a specific expression pattern, especially for 14 of them that are specifically expressed in pollen grains or pollen tubes (Qin et al., 2009; Wolf et al., 2009a). PMEs are classified in two distinct groups depending on the presence/absence of an N-terminal extension domain (the PRO region) showing similarity with the pectin methylesterase inhibitor (PMEI) domain (Micheli, 2001). PMEs from group 1 do not have a PMEI domain but can be inhibited by PMEIs (Röckel et al., 2008), whereas PMEs from group 2 can contain from one to three PMEI domains (Tian et al., 2006). It is hypothesized that the PRO region is cleaved during maturation of the PME, as so far, only PMEs lacking this domain were found in the cell wall (Micheli, 2001). Wolf et al. (2009b) have shown that the PRO region of the group 2 PMEs could regulate the release of the mature PME from the Golgi apparatus. It has also been reported that the PRO region could play an autoinhibitory role during maturation (Bosch et al., 2005).

The first direct evidence for the crucial roles of PMEs during pollen tube growth was described in two knockout mutants, *vanguard1* (*vgd1*; Jiang et al., 2005) and *Atppme1* (Tian et al., 2006). *VGD1* (At2g47040) encodes a pollen-specific group 2 PME. The functional disruption of *VGD1* resulted in the bursting of pollen tubes in vitro and the marked retardation of *vgd1* pollen tube elongation in the pistil, resulting in a strong reduction of male fertility and seed set. *AtPPME1* (At1g69940), coding for a pollen-specific group 1 PME, also was identified to play an important role in pollen tube growth (Tian et al., 2006). The lack of *AtPPME1* transcripts in the knockout mutant affected the shape and growth rate of pollen tubes, indicating that AtPPME1 is required for the integrity of the cell wall and the tip-polarized growth of the pollen tube (Tian et al., 2006).

Here, we report the study of a homozygous knockdown mutant for *AtPME48* during the imbibition and germination of pollen grains and pollen tube growth. We have investigated in vitro and in vivo pollen germination, pollen tube morphology and growth, as well as the level of PME activity and the DM of the HG by immunolabeling and Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy in mutant and wild-type plants. Our results show that the group 1 PME48, the second most expressed *PME* gene in pollen, plays a major role in remodeling the HG of the intine cell wall during Arabidopsis pollen grain maturation, resulting, after rehydration, in normal pollen grain germination.

RESULTS

Expression of Pollen-Specific PMEs Assessed by Quantitative Reverse Transcription-PCR

The expression of the 14 pollen-specific PME genes was analyzed by quantitative reverse transcription (qRT)-PCR on total RNA extracted from dry and imbibed (for 1 h in liquid germination medium [GM]) pollen grains and 6-h-old pollen tubes. Most PME genes were expressed in dry pollen grains, with a strong expression of PME4 (VGD1 homolog), PME5 (VGD1), PME37, and PME48 (Fig. 1A). During imbibition and in in vitro-grown pollen tubes, PME4, PME5, PME50, as well as PME48 were strongly expressed compared with the 10 other PMEs (Fig. 1, B and C). PME48 and PME50 belong to the group 1 PMEs, whereas PME4 and PME5, known as VGD1 homolog and VGD1 (Jiang et al., 2005), belong to the group 2 PMEs.

Tissue-Specific Expression of *AtPME48*

In order to check whether *PME48* is specifically expressed in pollen, the activity of the promoter of *PME48* was assessed using the *pPME48*::*GUS* and *pPME48*::*YFP* constructs. Fluorescence of the yellow fluorescent protein (YFP) was observed in dry (Fig.

Downloaded from www.plantphysiol.org on January 27, 2015 - Published by www.plant.org
Copyright © 2015 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

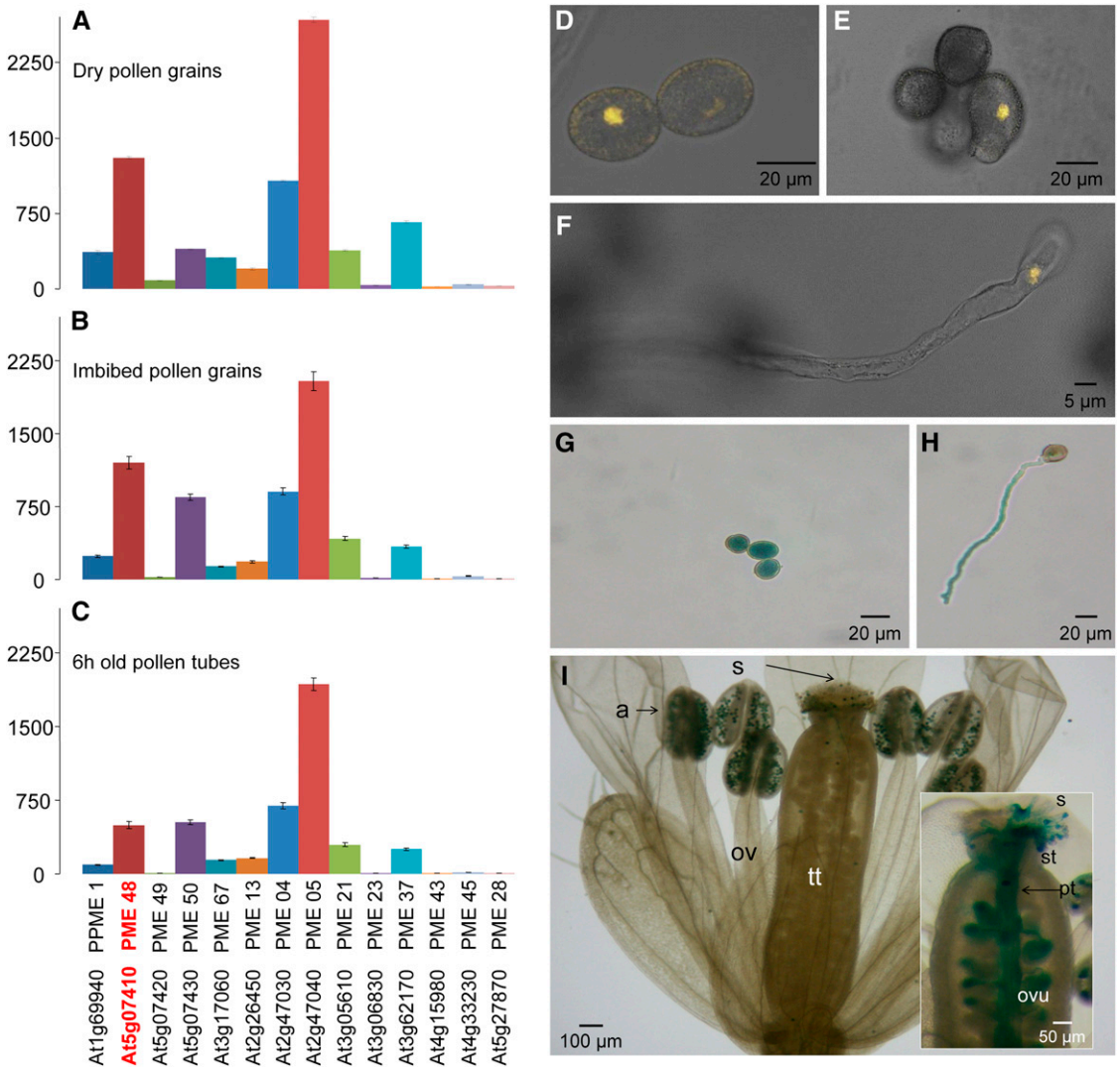


Figure 1. A to C, Relative gene expression of the 14 pollen-specific *PMEs* in wild-type dry pollen grains (A), 1-h imbibed pollen grains (B), and 6-h-old pollen tubes (C) measured using stably expressed reference genes (At3g28750, At3g57690, and At5g59370) in three biological samples with similar results. Only the results obtained with At3g28750 are shown. The locus and the corresponding UniProt name of each protein are indicated. The data correspond to means ± SD of three technical replicates of a biological sample. D to F, Analyses of the expression of the promoter of *PME48* using the *pPME48*::YFP construct by confocal microscopy in dry pollen grains (D), 1-h imbibed pollen grains (E), and during pollen tube growth (F). Images shown are overlays of the bright-field and fluorescent images. G to I, Analyses of the expression of the promoter of *PME48* using the *pPME48*::GUS construct in dry pollen grains (G), 3-h-old pollen tube (H), anthers (I), and self-pollinated pistil (inset in I). a, Anther; ov, ovary; ovu, ovule; pt, pollen tube; s, stigma; st, style; tt, transmitting tract.

1D) and imbibed (Fig. 1E) pollen grains and in 6-h-old in vitro-grown pollen tubes (Fig. 1F). GUS staining showed that the promoter activity of *PME48* was restricted to the male gametophyte (Fig. 1, G–I). GUS activity was detected in dry pollen grains (Fig. 1G) and in 6-h-old in vitro-grown pollen tubes (Fig. 1H). In vivo staining also showed a strong GUS activity in pollen grains within the anther and in germinated pollen grains deposited on the stigma (Fig. 1I). GUS staining was also clearly visible in pollen tubes growing through the transmitting tract (Fig. 1I, inset). Staining was observed neither in the vegetative organs of the transformed plants nor in pollen grains or pollen tubes from wild-type plants (data not shown).

Isolation and Characterization of the *pme48*−/− Homozygous Mutant Line

We selected a transfer DNA (T-DNA) insertion line from the Salk library. SALK_122970 contained a T-DNA insert in the *PME48* coding sequence. The T-DNA insertion was predicted to be located in the last exon of the sequence (Supplemental Fig. S1A). The homozygous

Downloaded from www.plantphysiol.org on January 27, 2015 - Published by www.plant.org
Copyright © 2015 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

mutant line (*pme48−/−*) has been isolated, two copies of the insert were amplified with the genomic DNA (Supplemental Fig. S1B), and the *PME48* transcript was not detectable by reverse transcription (RT)-PCR (Supplemental Fig. S1C). The vegetative organs of *pme48−/−* did not display any visible phenotype or growth defect compared with wild-type plants (data not shown).

The level of the *PME48* transcript was then analyzed by qRT-PCR in dry, imbibed pollen grains and 6-h-old pollen tubes. Unlike the data obtained by RT-PCR (Supplemental Fig. S1C), qRT-PCR revealed that *pme48−/−* was not a knockout but a knockdown mutant (Fig. 2). *PME48* was lightly expressed in dry (9%; Fig. 2A) and imbibed (10%; Fig. 2B) pollen grains and in 6-h-old pollen tubes (19%; Fig. 2C) compared with wild-type pollen grains and pollen tubes. 4′,6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining showed that *pme48−/−* pollen grains contained the two sperm cells and the vegetative nucleus as observed in wild-type pollen grains (Supplemental Fig. S2A). Using fluorescein diacetate (FDA), the viability assays showed that most *pme48−/−* pollen grains were viable (72.3% ± 3.7%), but slightly less than wild-type pollen grains (79% ± 4.6%; $P < 0.0001$, $n > 1{,}000$ for each sample; Supplemental Fig. S2, B and C). In addition, the length of wild-type dry pollen grains was also slightly higher (29.8 ± 0.15 μm) than that of *pme48−/−* pollen grains (28.8 ± 0.12 μm; $P < 0.0001$, $n = 550$ for each sample; Supplemental Fig. S2, D and E). Similarly, the length of the siliques of the mutant was 1.4 mm shorter than that of the wild type ($P < 0.0001$, $n = 210$ for each sample; Supplemental Fig. S2F). The silique of the mutant contained a reduced number of seeds (40.3 ± 1.33 seeds per silique) compared with the wild-type silique (48.6 ± 0.5 seeds per silique; $P < 0.0001$, $n = 210$ for each sample; Supplemental Fig. S2G).

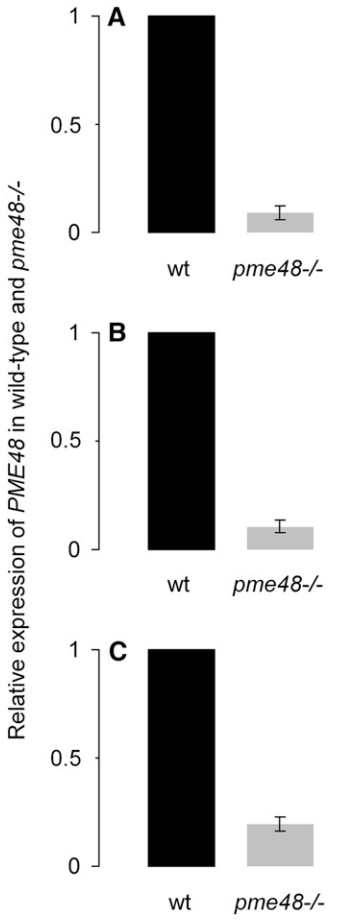


Figure 2. Relative gene expression of *PME48* in *pme48−/−* dry pollen grains (A), 1-h imbibed pollen grains (B), and 6-h-old pollen tubes (C) was measured using stably expressed reference genes (At3g28750, At3g57690, and At5g59370) in three biological samples with similar results. Only the results obtained with At3g28750 are shown. The data correspond to the ratio of expression in the wild type (wt) or *pme48−/−* compared with the wild type and are means ± SD of three technical replicates of a biological sample.

In Vitro and in Vivo Pollen Grain Germination and Pollen Tube Growth of *pme48−/−*

In the optimal solid GM described by Boavida and McCormick (2007), 65% and 90% of wild-type pollen grains were germinated after 6 and 24 h of culture, respectively (Fig. 3A). In contrast, the percentage of germinated *pme48−/−* pollen grains was reduced drastically, as only 10% of the pollen grains were germinated after 24 h of culture ($P < 0.0001$, $n > 10{,}000$ for each sample; Fig. 3A). In liquid medium, 71% and 73% germination was observed after 6 and 24 h of culture for the wild-type pollen grains (Supplemental Fig. S3A). In contrast, the level of *pme48−/−* pollen grain germination did not exceed 43.8% after 6 h of culture and reached only 60% after 24 h ($P < 0.0001$, $n > 10{,}000$ for each sample; Supplemental Fig. S3A). As *pme48−/−* pollen grains displayed a delay in germination, the speed of imbibition of the pollen grains was assessed by calculating the ratio of length to width. Dry pollen grains have ellipsoid shapes, and the length is approximately twice as much as the width. During imbibition, pollen grains become spherical and the length is nearly equal to the width; the length:width ratio is then approximately 1. On the optimal solid medium, the imbibition was faster for the wild-type pollen grains compared with the mutant. The smallest ratio was obtained after 24 h, with 1.16 and 1.39 for the wild-type and *pme48−/−*, respectively (Fig. 3B). After 24 h of culture, pollen grains from the mutant lines were less imbibed than the wild-type pollen grains imbibed for 6 h ($P < 0.0001$, $n > 500$ for each sample). The same result was observed in liquid medium ($P < 0.0001$, $n > 500$ for each sample; Supplemental Fig. S3B). Based on these observations, it appeared that the ability of the pollen grain to rehydrate was affected in *pme48−/−* mutant lines. The delay in germination was also observed in vivo. Hand pollination of emasculated wild-type pistils with wild-type or *pme48−/−* pollen grains showed that the wild-type

Downloaded from www.plantphysiol.org on January 27, 2015 - Published by www.plant.org
Copyright © 2015 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

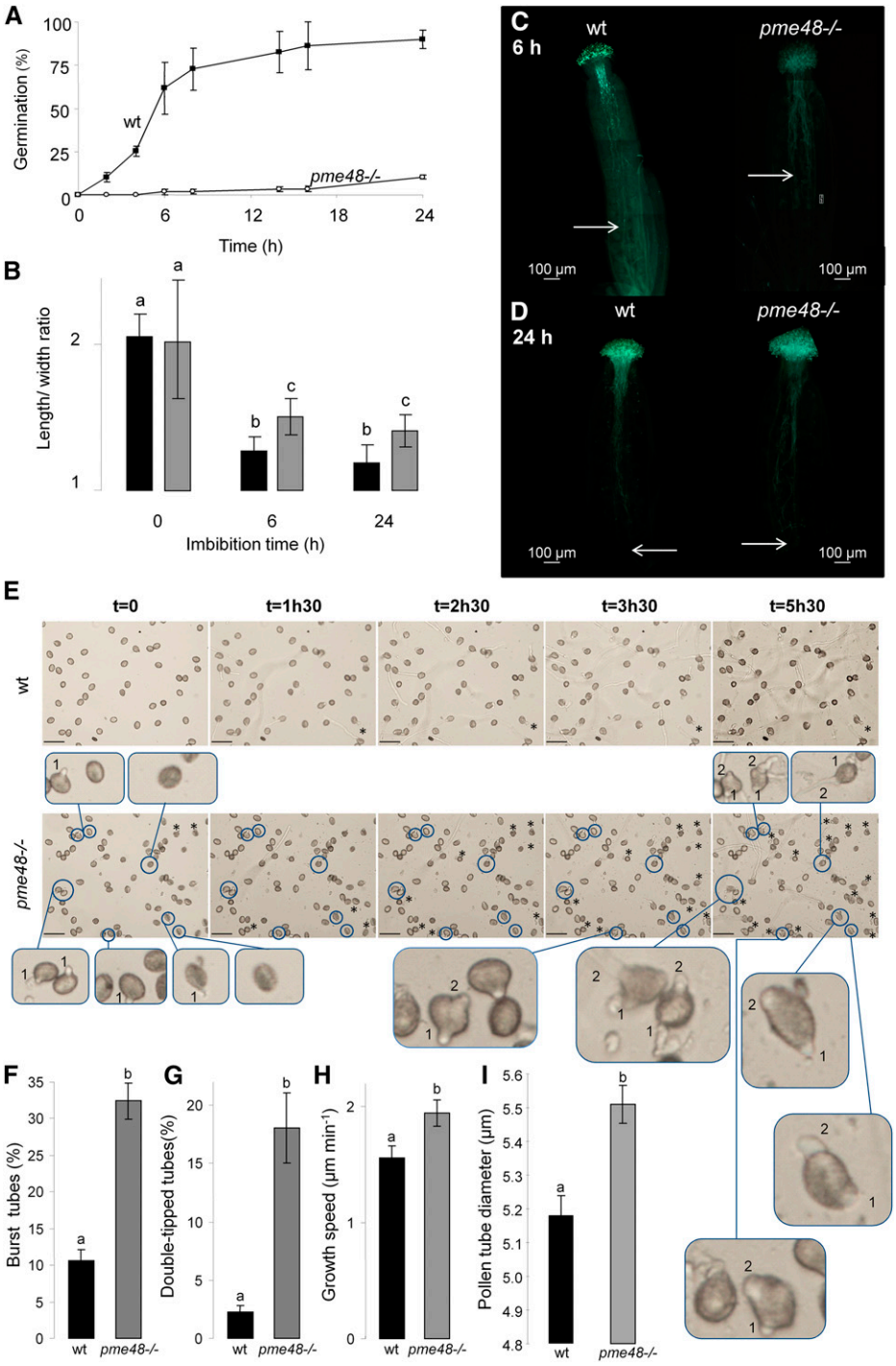


Figure 3. In vitro and in vivo germination of wild-type and *pme48−/−* pollen grains. A, Germination rate of wild-type (wt; black squares) and *pme48−/−* (white circles) pollen grains in the optimum solid medium. Pollen grains were considered germinated when the length of the tube was equal to the diameter of the pollen grain. B, Estimation of the imbibition rate by measuring the ratio of length to width of wild-type (black bars) and *pme48−/−* (gray bars) pollen grains. C and D, In vivo growth of wild-type and *pme48−/−* pollen tubes in wild-type pistil at 6 h (C) and 24 h (D) after hand pollination revealed by Aniline Blue staining. Arrows indicate the locations that most of the pollen tubes have reached in the transmitting tissue. Bars = 100 μm. E, Time-lapse images of wild-type and *pme48−/−* pollen germination in liquid medium showing two emerging tips from the pollen grain (blue circles) and burst tubes (asterisks). Numbers in the closeup images indicate which tubes emerged first. Closeup images of abnormal phenotypes were observed in the mutant line compared with the wild type. Bars = 50 μm. F, Estimation of the rate of burst pollen tubes in the wild type (black bar) and *pme48−/−* (gray bar). G, Estimation of the rate of pollen grains with two emerging tips in the wild type (black bar) and *pme48−/−* (gray bar). H, Estimation of the growth speed of wild-type (black bar) and *pme48−/−* (gray bar) germinated pollen tubes. I, Comparison of the pollen tube diameters between the wild type (black bar) and *pme48−/−* (gray bar) grown in liquid GM for 4 h. Different letters indicate statistically significant differences between the wild-type and *pme48−/−* lines, as determined by Student's *t* test ($P < 0.0001$); $n >$ 10,000 in A; $n > 500$ in B, F, and G; $n > 35$ in H; $n = 126$ for the wild type and $n = 172$ for *pme48−/−* from four independent experiments in I.

pollen tubes had traveled two-thirds of the transmitting tract after 6 h (Fig. 3C, left) and completed their journey by reaching the bottom of the ovary after 24 h (Fig. 3D, left). In contrast, *pme48−/−* pollen tubes had reached only one-half of the transmitting tract after 6 h (Fig. 3C, right), but after 24 h, *pme48−/−* pollen tubes also had reached the base of the ovary (Fig. 3D, right).

In addition to lower germination rates, *pme48−/−* displayed a remarkable phenotype, as shown on the representative images obtained by time-lapse video during the germination of pollen grains and the growth of pollen tubes (Fig. 3E). Wild-type pollen grains had already germinated 90 min after immersion in the liquid medium (Fig. 3E, top), the proportion of burst tubes was around 10% (Fig. 3F), the growth rate was about 1.5 μm min^{-1} during the first 90 min of growth (Fig. 3H; Supplemental Fig. S4), and pollen tubes displayed a normal phenotype (Fig. 3E; Supplemental Movie S1).

Downloaded from www.plantphysiol.org on January 27, 2015 - Published by www.plant.org
Copyright © 2015 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

On the other hand, *pme48−/−* pollen tubes appeared to be more unstable, with 32% of burst tubes ($P < 0.0001$, $n > 500$ for each sample; Fig. 3F). Moreover, a significant number of *pme48−/−* pollen grains (18%) displayed two tips emerging from the same pollen grain ($P < 0.0001$, $n > 500$ for each sample; Fig. 3, E and G, bottom closeup images). The first tip emerged from pollen grains, and after 4 to 5 h of culture, a second tip emerged from the same pollen grain (pollen grains circled in blue; Fig. 3E, bottom closeup images; Supplemental Movie S2). Once germinated and if pollen tubes were produced, the growth speed of *pme48−/−* pollen tubes was slightly faster compared with wild-type pollen tubes ($P < 0.0001$, $n > 35$ for each sample; Fig. 3H; Supplemental Fig. S4). Another consequence of the *PME48* mutation was that pollen tubes growing in liquid GM displayed larger diameters than wild-type pollen tubes (Figs. 3I and 4, A and H). The *pme48−/−* pollen tube diameters were significantly wider (5.51 ± 0.05 μm) compared with wild-type pollen tubes (5.18 ± 0.06 μm; $P < 0.0001$, $n = 126$ for wild-type pollen tubes and $n = 172$ for *pme48−/−* pollen tubes; Fig. 3I).

Immunolabeling of Highly Methylesterified HG in Pollen Grains and Pollen Tubes

Cell surface immunolocalization of highly methylesterified HG with the monoclonal antibody LM20 revealed that the epitopes were almost exclusively restricted to the tip region of wild-type pollen tubes (Fig. 4, A–E). Pollen grains from wild-type plants showed a very weak, almost no, labeling of the intine wall (Fig. 4, C–E). Similar results were obtained on semithin sections (Fig. 4, F and G). In contrast, the labeling of *pme48−/−* pollen tubes was not restricted to the tube tip but extended to the subapical region of the tube, but with the strongest fluorescence at the tip (Fig. 4, H–K). Finally, *pme48−/−* pollen grains displayed a more intense fluorescence of the intine wall by cell surface immunolabeling (Fig. 4, J–L) and on semithin sections (Fig. 4, M and N) compared with the wild type.

Immunolabeling with the monoclonal antibody LM19 that recognizes weakly methylesterified HG epitopes did not reveal any noticeable difference between the wild type and *pme48−/−* (data not shown). LM19 and LM20 show overlapping binding capabilities to different levels of methylesterification, except for totally deesterified HG epitopes that are only recognized by LM19 (Verhertbruggen et al., 2009). Therefore, these results suggest that highly methylesterified HG epitopes were more abundant in the intine wall of *pme48−/−* pollen grains compared with the wild type.

PME Activity and DM of HG in *pme48−/−*

In order to assess further the biochemical differences between the wild type and *pme48−/−*, we investigated the total PME activity in pollen grains by using enzymatic assays. The data showed a 50% reduction of total PME activity in *pme48−/−* pollen grains compared with the wild type (Fig. 5A). Moreover, a zymogram after isoelectric focalization (IEF) of total proteins extracted from pollen grains revealed the disappearance of a diffuse band in the pI range between 8.2 and 9 in *pme48−/−* (Fig. 5B) that may correspond at least in part to PME48, which has a predicted pI of 8.3. Two spots, at pI ranging from 9.8 to 10.2 and from 9.5 to 9.7, in the range of predicted pIs of other pollen PMEs did not show any visible change in activity (Fig. 5B). These

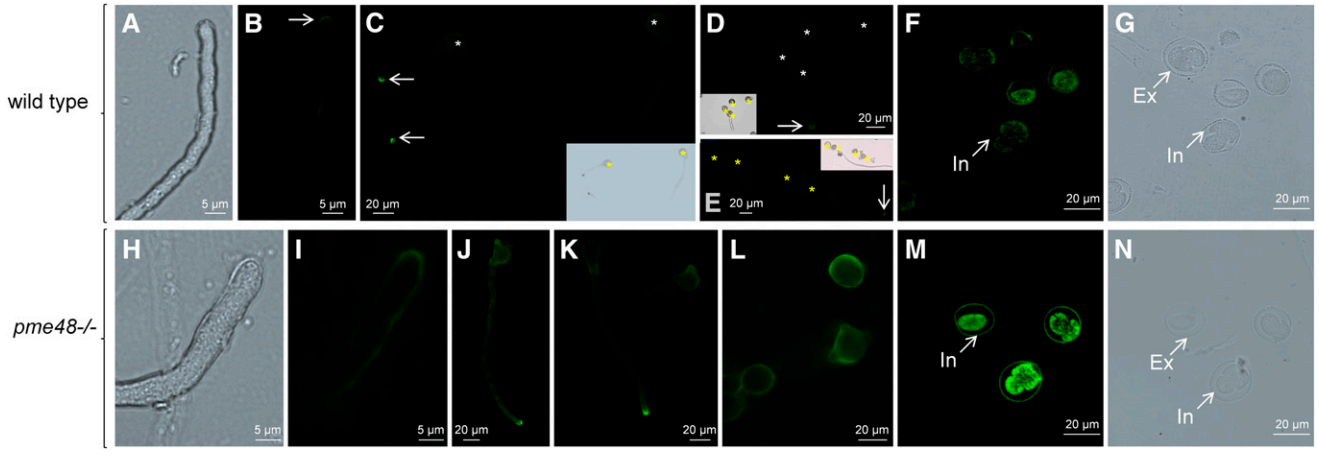


Figure 4. Immunolocalization of highly methylesterified HG epitopes probed with LM20 in wild-type and *pme48−/−* pollen grains and pollen tubes. A to E, Cell surface immunolabeling in wild-type pollen grains and pollen tubes. F and G, Immunolabeling on semithin sections of wild-type dry pollen grains. H to L, Cell surface immunolabeling in *pme48−/−* pollen grains and pollen tubes. M and N, Immunolabeling on semithin sections of *pme48−/−* dry pollen grains. Asterisks indicate pollen grains, and arrows point to pollen tube tips. Ex, Exine; In, intine.

Downloaded from www.plantphysiol.org on January 27, 2015 - Published by www.plant.org
Copyright © 2015 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

biochemical data support the qRT-PCR results that clearly showed a significant reduction of *PME48* expression. Finally, the DM of HG was estimated by FT-IR spectroscopy in hot water-soluble pectin-enriched fractions extracted from dry pollen grains (Fig. 5, C and D). A marked difference was observed at 1,740 cm^{-1} assigned to the vibration of methylester groups of HG (Fig. 5C). The relative absorbance at this wave number was higher in *pme48−/−* pollen grains. The DM of the HG was consistently higher in the *pme48−/−* (32.5% ± 1.7%) compared with the wild-type (13.4% ± 1.1%) pollen grains (Fig. 5D). As deesterified HG binds more Ca^{2+} than esterified HG, our data may suggest that HGs in the intine wall of *pme48−/−* are less associated with Ca^{2+} compared with wild-type pollen grains.

Supplementation of Ca^{2+} to the GM Restores the Phenotype of *pme48−/−*

To assess if the germination defect of *pme48−/−* pollen grains was related to the possible lower Ca^{2+} sink in the intine wall due to the higher DM of the HG, the optimum culture medium containing 5 mM $CaCl_2$ was supplemented with 2.5 mM $CaCl_2$ to reach a final concentration of 7.5 mM or with the Ca^{2+} chelator, EDTA. In the presence of 1 mM EDTA, none of the wild-type and *pme48−/−* pollen grains germinated, even after 24 h of culture ($n > 1{,}000$; Fig. 6, A and B). In the medium supplemented with Ca^{2+}, *pme48−/−* pollen grain germination rates were restored, reaching levels similar to those observed with wild-type pollen grains ($n > 1{,}000$). The percentage of pollen germination reached 52% and 90% after 6 and 24 h, respectively (Fig. 6, A and B). Moreover, the speed of imbibition of *pme48−/−* pollen grains was as fast as that of the wild-type pollen grains (Fig. 6C). In addition, a significant reduction of the abnormal phenotypes, such as burst tubes (from 33% to 13%; Figs. 3F and 6D) and double-tipped tubes (from 18% to 2%; Figs. 3G and 6E), was observed in *pme48−/−* pollen grains cultured in the supplemented GM. Finally, in the $CaCl_2$-supplemented medium, the rates of burst tubes increased in wild-type pollen grains (32%; Fig. 6D) compared with those observed when pollen grains were grown in the optimum GM (approximately 10%; Fig. 3F).

DISCUSSION

The regulation of the DM of HG has been implicated in many aspects of plant development (Wolf et al., 2009a), including cell adhesion (Tieman and Handa, 1994; Wen et al., 1999; Mollet et al., 2000; Bouton et al., 2002; Mouille et al., 2007; Durand et al., 2009), adventitious rooting (Guénin et al., 2011), primordia emergence at the shoot apical meristem (Peaucelle et al., 2008, 2011), fruit ripening (Brummell and Harpster, 2001; Phan et al., 2007), and plant defense (Bethke et al., 2014). Although data have shown an important role for

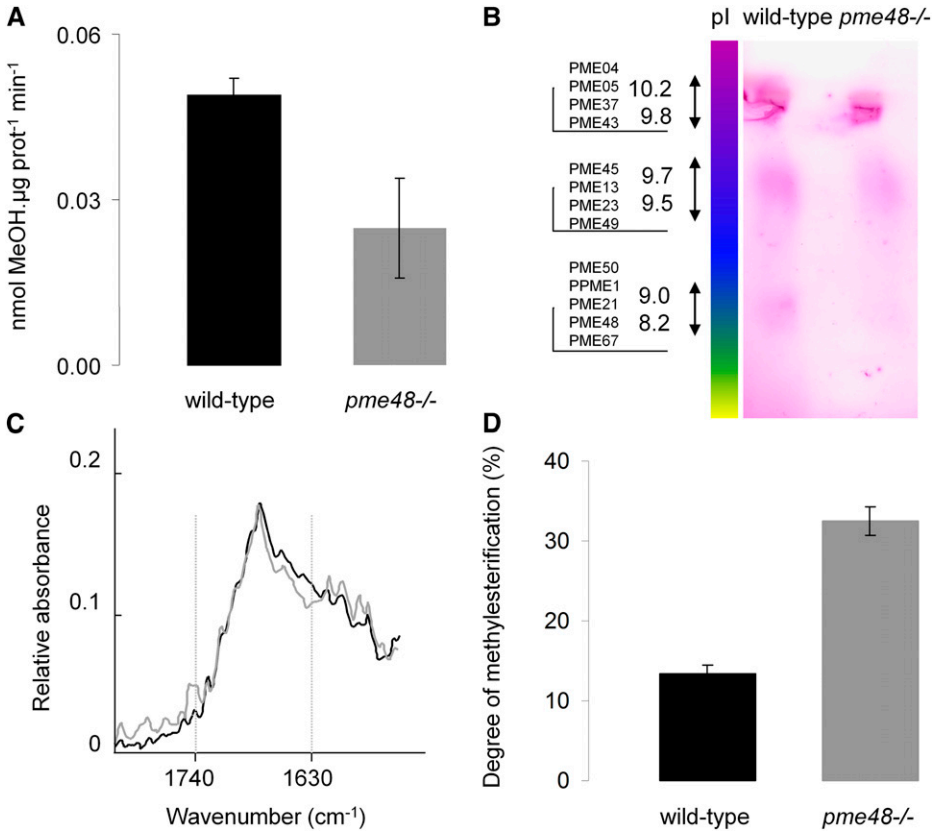


Figure 5. Biochemical analyses of wild-type and *pme48−/−* dry pollen grains. A, Enzymatic assay of the total PME activity contained in wild-type (black bar) and *pme48−/−* dry (gray bar) pollen grains. MeOH, Methanol. B, Zymogram after IEF of PMEs contained in wild-type and *pme48−/−* dry pollen grains. A diffuse band corresponding to the pI (8.2) of PME48 is lacking in *pme48−/−* dry pollen grains. C and D, Determination of the DM of the HG in dry pollen grains by FT-IR spectroscopy. C, Representative FT-IR spectra of pectin-enriched fractions extracted from wild-type (black trace) and *pme48−/−* (gray trace) dry pollen grains. D, Quantification of the DM of HG in wild-type (black bar) and *pme48−/−* (gray bar) pollen grains. Data are means of three biological replicates ± SD.

Downloaded from www.plantphysiol.org on January 27, 2015 - Published by www.plant.org
Copyright © 2015 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

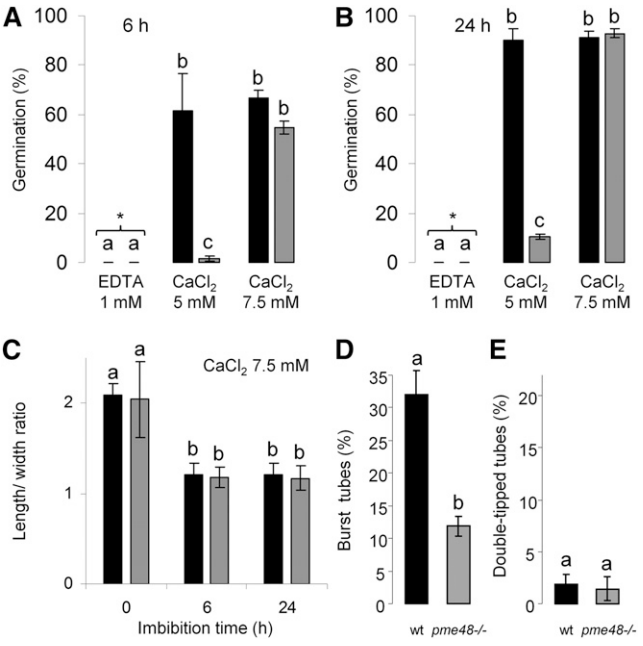


Figure 6. Effect of calcium on the germination and phenotype of pollen tubes. A and B, Germination percentage of wild-type (black bars) and *pme48−/−* (gray bars) pollen grains in the optimal solid medium (5 mM $CaCl_2$), in the optimal solid medium supplemented with 1 mM EDTA, and in the optimal medium supplemented with 2.5 mM calcium (i.e. final concentration of $CaCl_2$, 7.5 mM) after 6 h (A) and 24 h (B) of growth. Pollen grains were considered germinated when the length of the tube was equal to the diameter of the pollen grain. C, Estimation of the imbibition rate by measuring the ratio of length to width of wild-type (black bars) and *pme48−/−* (gray bars) pollen grains in the solid medium containing 7.5 mM $CaCl_2$. D, Estimation of the rate of burst pollen tubes in the wild type (wt; black bar) and *pme48−/−* (gray bar) in solid medium containing 7.5 mM $CaCl_2$. E, Estimation of the rate of pollen grains with two emerging tips in the wild type (black bar) and *pme48−/−* (gray bar) in solid medium containing 7.5 mM $CaCl_2$. Different letters indicate statistically significant differences between the wild-type and *pme48−/−* lines, as determined by Student's *t* test ($P < 0.0001$); $n > 1{,}000$ in A and B; $n > 500$ in C; and $n > 250$ in D and E.

the pectin demethylesterification process in pollen tetrad separation (Francis et al., 2006) and pollen tube growth (Jiang et al., 2005; Tian et al., 2006), the involvement of PMEs during pollen germination is still poorly understood. Among the 66 predicted *PME* genes in the genome of Arabidopsis, 14 are specifically expressed in the male gametophyte (data from Genevestigator [Hruz et al., 2008] and EFP Browser [Winter et al., 2007]). Two of them have already been studied using functional genomics approaches. The first one is VGD1 (At2g47040), the alteration of which led to unstable pollen tubes and retarded growth of the pollen tube in the style and transmitting tract, resulting in a significant reduction of male fertility (Jiang et al., 2005). The second pollen-specific PME characterized to date is PPME1 (At1g69940; Tian et al., 2006). The homozygous mutant *Atppme1* displayed reduced growth and irregular shape of pollen tubes grown in vitro. In this study, we show that alteration of the expression of *PME48*, the second most expressed *PME* in pollen grains, results in a strong delay in imbibition and in germination both in vivo and in vitro, as well as altered phenotypes with abnormal rates of burst tubes and two pollen tube tips emerging from the same pollen grain. The phenotype is rescued by supplementing the optimum GM (Boavida and McCormick, 2007) with 2.5 mM $CaCl_2$ to reach 7.5 mM. In 7.5 mM $CaCl_2$, *pme48−/−* pollen grains imbibed and germinated normally. These data suggest that PME48 is mainly involved in the remodeling of the intine cell wall during maturation of the pollen grain. The reduction of PME48 activity also has consequences later on pollen tube morphology. The pollen tubes are slightly wider in the mutant, which may reflect the role of HG in the mechanical properties of the cell wall (Parre and Geitmann, 2005a; Palin and Geitmann, 2012) and corroborates the predictions made by mechanical simulations (Chebli and Geitmann, 2007; Zerzour et al., 2009; Fayant et al., 2010). The more abundant highly methylesterified HG in the intine wall of *pme48−/−* pollen grains and at the tip and in the subapical region of *pme48−/−* pollen tubes provides more viscoelasticity and less rigidity of the cell wall, thus promoting several tips emerging from the pollen grain and wider diameters of pollen tubes, probably due to the internal turgor pressure (Parre and Geitmann, 2005a; Winship et al., 2010).

Mature pollen grains are surrounded by two cell walls: the outer exine and the inner intine. In many species, such as tobacco (Li et al., 1995), Arabidopsis (Van Aelst and Van Went, 1992; Rhee and Somerville, 1998), *Lilium hybrida* (Aouali et al., 2001), *Euphorbia peplus* (Suárez-Cervera et al., 2002), *Zygophyllum fabago* (Castells et al., 2003), and *Larix decidua* (Rafińska et al., 2014), the intine of mature pollen grains is mostly composed of weakly methylesterified HG or a mix of highly and weakly methylesterified HGs, the latter being more abundant. The almost absent labeling of weakly methylesterified HG with John Innes Monoclonal5 at the pollen mother cell and tetrad stages (Rhee and Somerville, 1998) but its strong detection in the intine at the late microspore stage and mature dry Arabidopsis pollen grains (Van Aelst and Van Went, 1992; Rhee and Somerville, 1998) indicate an early action of PMEs during pollen formation and maturation. HG polymers are synthesized in the Golgi apparatus and may be secreted under a highly methylesterified form and then processed in the cell wall by PMEs (Zhang and Staehelin, 1992; Caffall and Mohnen, 2009; Harholt et al., 2010). This is consistent with our qRT-PCR results showing that pollen-specific PMEs, including *PME48*, are strongly expressed in dry pollen grains. A similar pattern of expression of these *PMEs* was obtained previously in two transcriptomic analyses of dry pollen grains and pollen tubes (Wang et al., 2008; Qin et al., 2009). Moreover, proteomic analyses of Arabidopsis revealed the presence of at least three PMEs in mature pollen grains: PME37, PPME1, and PME48 (Holmes-Davis et al., 2005; Ge et al., 2011). Similarly, at least two PMEs were found in the

Downloaded from www.plantphysiol.org on January 27, 2015 - Published by www.plant.org
Copyright © 2015 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

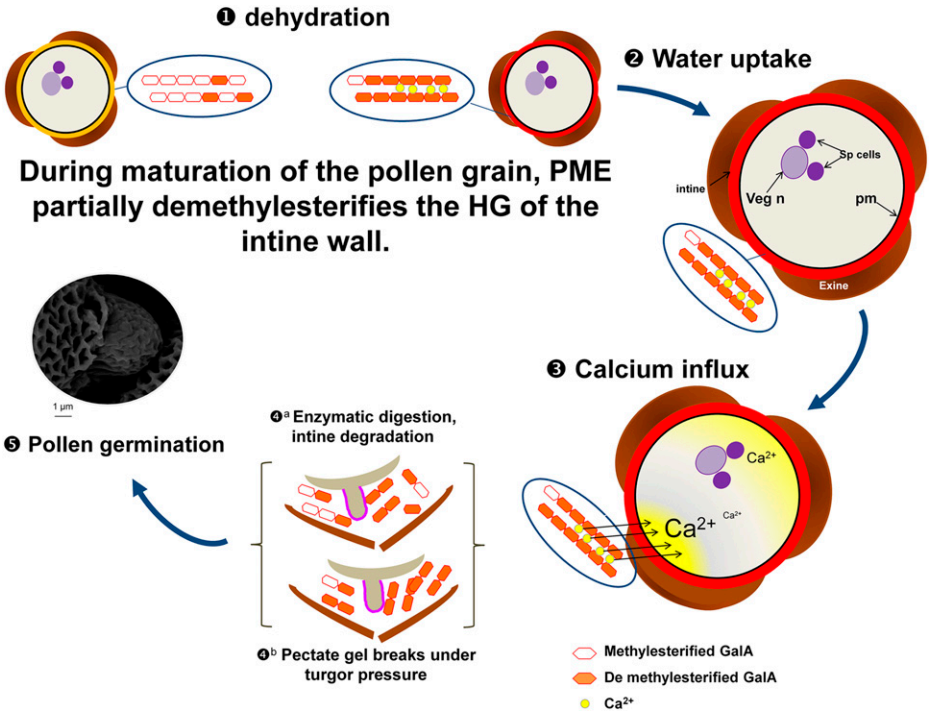


Figure 7. Model showing the possible mode of action of PME48 during pollen dehydration, imbibition, and germination. 1, PME48 may be secreted in the intine wall during the maturation of the pollen grain and start to act on the methylesterified form of the HG by random or block-wise actions. Methylesterified HG of the intine (black) is then transformed in weakly methylesterified HG (orange). The dry pollen grain contains mostly weakly esterified HG that could form pectate gel with calcium. 2, Imbibition of the pollen grain is enhanced by the presence of the more hydrophilic weakly methylesterified HG. 3, The source of calcium creating the calcium influx in the pollen grain may originate, at least partially, from the release of Ca^{2+} from the pectate gel, thus weakening the mechanical properties of the intine. 4, The intine may be degraded by PGases and/or PLs (a) and/or break under the turgor pressure (b). 5, These processes may promote the emergence of the pollen tube tip and allow the germination of the pollen grain. GalA, (1,4)-α-D-GalUA; pm, plasma membrane; Sp, sperm cells; Veg n, vegetative nucleus.

proteome of rice (*Oryza sativa*; Dai et al., 2006) and maize (Zhu et al., 2011) dry pollen grains.

The early demethylesterification of HG by PME48 during pollen formation and maturation (Fig. 7) may have three major consequences. First, the removal of hydrophobic methylester groups can enhance the hydrophilic properties of the cell wall, thus promoting pollen grain hydration (Fig. 7). The DM of HG can affect the water-holding capacity of the pectate gel (Willats et al., 2001), leading to water loss and changes of the physical properties of the pectate gel, which appeared to collapse under pressure (Willats et al., 2001). The *mucilage modified2* (*mum2*) mutant (impaired in the expression of a β-galactosidase) failed to properly hydrate the seed mucilage (Macquet et al., 2007). Interestingly, in the mucilage of *mum2*, the content of methylesterified HG increased compared with the wild type, suggesting that (1) β-galactosidase may be required for PME activity (Western et al., 2001; Walker et al., 2011) and (2) PME activity is required for the hydration of HGs. This observation may explain why, in the *pme48−/−* mutant lines, the imbibition and germination of pollen grains were strongly delayed, as the DM of the HG in the intine of *pme48−/−* is almost 2.5-fold higher than in the wild type. Second, upon the block-wise action of PMEs, deesterified blocks of HG chains can be cross-linked with calcium (Micheli, 2001). During wild-type pollen grain formation and maturation, the activity of PME48 promotes the release of negative charges of the carboxylic groups, allowing the interaction of calcium with the HG chains. The main Ca^{2+} sink in the plant cell wall is the demethylesterified HG (Wolf et al., 2009a; Hepler et al., 2012). Thus, the unesterified HG in the maturing pollen grain may act as a reservoir of Ca^{2+} that will be used later during rehydration and germination (Fig. 7). The reduction of PME activity in *pme48−/−* may locally affect the binding capacity of calcium ions by HGs. This possibly may explain the reverse phenotype observed in the calcium-supplemented GM. In vitro pollen germination of many species requires Ca^{2+} (Brewbaker and Kwack, 1963; Ge et al., 2007), and Ca^{2+} plays a central role during pollen germination (Brewbaker and Kwack, 1963; Ge et al., 2007; Hepler et al., 2012), acting putatively as a signal to activate the germination process and/or acting directly on the physical property of the intine. Ca^{2+} dynamics have been investigated in Arabidopsis pollen grains during germination (Iwano et al., 2004).

Downloaded from www.plantphysiol.org on January 27, 2015 - Published by www.plant.org
Copyright © 2015 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

Those authors have shown that, during pollen grain hydration, cytoplasmic Ca^{2+} increased at the future site of protrusion of the pollen tube tip but not exclusively, as, often, an increase also was observed at the opposite site (Fig. 7). The early action of PME48 during the maturation and dehydration of pollen grains and the accumulation of Ca^{2+} in the intine may help to prepare the future protrusion of the pollen tube tip by weakening the intine wall (Fig. 7). Recently, Rafińska et al. (2014) suggested that the cell wall of the female tissues also can act as a reservoir of Ca^{2+} in order to ensure correct germination and pollen tube growth in *L. decidua*. Upon pollination, an increase of Ca^{2+} concentration also was observed in the stigma and transmitting tract of lily (Zhao et al., 2004) and tobacco (Ge et al., 2009). This observation may explain why the impact of the *PME48* mutation on in vivo pollen germination and tube growth was not as dramatic as that in vitro in the optimum solid GM. However, we cannot rule out that PMEs originating from the stigma also may participate in this process or that pollen grains cultured in in vitro and semi-in vivo conditions display a different gene expression pattern (Qin et al., 2009).

As discussed by Jolie et al. (2010), the pH, the DM, and the pattern of methylesterification are known to modify the mode of action of PMEs (Catoire et al., 1998; Denès et al., 2000; Sénéchal et al., 2014). Thus, we can also hypothesize that, upon random action of the PME (PME48 or others from the 13 other pollen-specific PMEs), the partial removal of methylester groups may allow other pectin-degrading enzymes such as PGases and/or PLs to cleave the HG, affecting the rigidity of the cell wall (Micheli, 2001; Sénéchal et al., 2014). In the Arabidopsis genome, 69 annotated genes can be classified as putative PGases (González-Carranza et al., 2007). A semiquantitative RT-PCR analysis investigating 66 among the 69 genes coding for PGases showed that 32 genes were strongly expressed in flower tissues (Kim et al., 2006). Other studies also have shown that PGases were present in ungerminated pollen grains of *Brassica napus* (Dearnaley and Daggard, 2001) and during hydration of *Platanus acerifolia* pollen grains (Suárez-Cervera et al., 2005). In addition, in *Brassica campestris*, alteration of the expression of *B. campestris MALE FERTILITY2* (coding for a putative PGase) resulted in an overdeveloped intine and abnormal germination (Huang et al., 2009). The transcriptome analysis of Arabidopsis pollen grains has revealed that six genes coding for putative PGases and four genes encoding putative PLs are strongly expressed in dry pollen grains and pollen tubes (for review, see Mollet et al., 2013). Taken together, these observations suggest that the early action of PME48 during maturation of the pollen grain also may be required to ensure the future degradation of the intine by PGases and PLs (Fig. 7). Enzymes originating from the stigma also may participate in the degradation of HGs in the intine. Such enzymes, including PGases, have been found in the exudates from lily and olive (*Olea europaea*) stigmas (Rejón et al., 2013).

Although pollen-specific PMEs are traditionally associated with pollen tube elongation, this study provides substantial evidence that PMEs, especially PME48, also are directly implicated in changes of the mechanical properties of the intine wall during maturation, promoting the correct germination of mature pollen grains.

MATERIALS AND METHODS

Plant Materials, Growth Conditions, and Mutant Genotyping

Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia-0) wild-type and mutant seeds, stored at 4°C, were spread on the surface of sterile soil and cultured in a growth chamber with a photoperiod of 16 h of light/8 h of dark at 20°C during the light phase and at 16°C in the dark phase with 60% humidity with daily watering.

pme48−/− (mutant of the *PME48* gene; At5g07410) seeds originated from the Arabidopsis Biological Resource Center and corresponded to SALK_122970 (T-DNA 1,403 bp downstream of ATG). Homozygous plants for the T-DNA insertion in the *PME48* gene were identified by PCR. Genotyping PCR was performed with primer pair PME48-F1 (5′-TGACAAGACCGTGTTCTACG-3′)/PME48-R1 (5′-GAAGAGAGGATTTCTGGAAATTGA-3′) and LB (5′-GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT-3′) matching with the left border of the T-DNA.

qRT-PCR Analyses

Gene Expression of Pollen-Specific PMEs

Total RNA was extracted from pollen of 6-week-old wild-type and *pme48−/−* plants using the NucleoSpin RNA Plant Kit (Macherey-Nagel) as described by the supplier. After RNA quantification using NanoDrop spectrophotometry and a DNase treatment, 100 ng of RNA was converted into single complementary DNAs (cDNAs) with the QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) following the instructions of the supplier.

Real-time quantitative PCR analyses were performed on 1:5 diluted cDNA. For real-time quantitative PCR, the LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche; catalog no. 04887352001) was used on 384-well plates in the LightCycler 480 Real-Time PCR System (Roche). The crossing threshold values for each sample (the number of PCR cycles required for the accumulated fluorescence signal to cross a threshold above the background) were acquired with the LightCycler 480 software (Roche) using the second derivative maximum method. Primers used are shown in Supplemental Table S1. Stably expressed reference genes (At3g28750, At3g57690, and At5g59370), specifically designed for this study on pollen grains, were selected using GeNorm software (Vandesompele et al., 2002). They were used as internal controls to calculate the relative expression of target genes according to the method described by Gutierrez et al. (2009). Each amplicon was first sequenced to ensure the specificity of the amplified sequence.

Analysis of PME48 Transcripts in Mutant Lines

The lack of *PME48* transcript in *pme48−/−* was checked by RT-PCR using PME48-F2 (5′-CTGGAACTGGAGGAGGAACT-3′) and PME48-R2 (5′-CATAAATCTCAACTCCTCCATG-3′). PCR was performed on the cDNA generated from total RNA extracted from 6-h-old pollen tubes grown in vitro. Primers used for the RT-PCR are in boldface and underlined in Supplemental Figure S1D.

Analysis of Promoter Activity

GUS Staining

Mutant seeds containing 1 kb of the promoter of At5g07410 upstream of the GUS coding sequence were generated as described by Louvet et al., (2006).

GUS staining was performed on dry pollen grains, in vitro-grown pollen tubes, and in vivo on self-pollinated flowers. Flower and dry pollen grain samples were fixed in cold acetone for 20 min and rinsed three times in 50 mM phosphate buffer, pH 7, containing 2 mM potassium ferricyanide, 2 mM

Downloaded from www.plantphysiol.org on January 27, 2015 - Published by www.plant.org
Copyright © 2015 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

potassium ferrocyanide, and 0.2% (v/v) Triton X-100. In vitro-grown pollen tube samples were not incubated in acetone. Samples were then incubated for 16 h in the dark at 37°C in 50 mM phosphate buffer, pH 7, containing 1 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-glucuronic acid, 2 mM potassium ferricyanide, 2 mM potassium ferrocyanide, and 0.2% (v/v) Triton X-100. Flower samples were then cleared with several washes in 70% (v/v) ethanol.

Analysis of the Activity of the Promoter of PME48 Using YFP

The promoter of the PME48 gene (At5g07410) was PCR amplified from a plasmid construct containing this sequence cloned upstream of the GUS coding sequence in the pBI101.3 binary vector (Louvet et al., 2006). A ligation-independent cloning method was used to insert the promoter of the *PME48* gene (*pPME48*) upstream of the super YFP (Kremers et al., 2006) in a ligation-independent cloning binary vector, named pPLV06 (GenBank accession no. JF909459) and belonging to the set of plant ligation-independent cloning vectors made by De Rybel et al. (2011). This vector also contains the Simian Virus40 nuclear localization signal. The PCR-amplified promoter insert contained in the plasmid construct was subsequently verified by sequencing, and the plasmid was used to transform *Agrobacterium tumefaciens* GV3101::pSOUP (Hellens et al., 2000). Arabidopsis plants were transformed by floral dip as described by Zhang et al. (2006) and selected on kanamycin (25 mg L^{-1}).

In Vitro Pollen Tube Growth

Pollen grains were grown in vitro in a liquid medium according to the method described by Boavida and McCormick (2007). Briefly, flowers (40 per 1.5-mL tube) were submerged in 1 mL of GM (pH 7.5) containing 5 mM $CaCl_2$•$2H_2O$, 0.01% (w/v) H_3BO_3, 5 mM KCl, 1 mM $MgSO_4$•$7H_2O$, and 10% (w/v) Suc. Tubes were shaken with a vortex to release the pollen grains from the anthers. Flowers were removed with a pair of tweezers, and the pollen suspension was then centrifuged at 4,000*g* for 7 min. New GM (250 μL) was added to the pellet, and pollen grains were transferred into glass vials (14 × 45 mm) and grown in a growth chamber in the dark at 22°C. For solid medium culture, 1.5% agarose (Sigma) was added to the GM and deposited on a microscope slide. After polymerization, wild-type or mutant open flowers were gently brushed on the surface of the agarose pad to release the pollen grains. Glass slides were then placed in a growth chamber in the dark at 22°C under 100% relative humidity. Before any further manipulation, pollen germination and pollen tube growth were assessed with a microscope.

Twenty images per sample were acquired after 2, 4, 6, 8, 14, 16, and 24 h of culture, and the percentage of germination ($n > 10{,}000$) and the speed of growth of pollen tubes ($n > 35$) were measured using ImageJ software (Abràmoff et al., 2004). Germination assays and the speed of growth of pollen tubes were repeated six times. For measurement of the diameter of pollen tubes, wild-type and *pme48−/−* pollen grains were harvested by dabbing flowers onto silane-coated microscope slides. Slides were incubated at 30°C for 30 min in a moist chamber, subsequently covered with liquid GM, and grown for 4 h in a growth chamber in the dark at 22°C. The diameter of pollen tubes was determined on the images with ImageJ ($n = 126$ and $n = 172$ for wild-type and *pme48−/−* pollen tubes, respectively, from four independent experiments).

Pollen grains were also cultured in the GM supplemented with 1 mM EDTA or 2.5 mM $CaCl_2$•$2H_2O$ to reach the final concentration of 7.5 mM $CaCl_2$.

In Vivo Pollen Tube Growth

Emasculated mature flowers from wild-type plants were hand pollinated with wild-type or mutant (*pme48−/−*) pollen grains. The pollinated pistils were collected 6, 12, and 24 h after pollination and fixed in an ethanol:acetic acid (3:1, v/v) solution. The fixed pistils were rehydrated with successive baths of ethanol (70%, 50%, and 30% [v/v]), washed three times with distilled water, and treated overnight in a softening solution composed of 8 M NaOH. After several washes with distilled water, the pistil tissues were stained with decolorized Aniline Blue solution (0.1% [w/v] Aniline Blue in 100 mM K_3PO_4 buffer, pH 11) for 2 h in the dark (Johnson-Brousseau and McCormick, 2004).

Viability Test and DAPI Staining

The viability of pollen grains was assessed using FDA dissolved in acetone at 10 mg mL^{-1} and stored at −20°C. Prior to each experiment, FDA was diluted in a 10% Suc solution to a final concentration of 0.2 mg mL^{-1}. Hydrated pollen grains were dipped in 250 μL of the FDA solution on a glass slide and kept in the dark for 5 min. A minimum of 1,000 pollen grains were analyzed.

The nuclei of the pollen grains were stained with 10 μg mL^{-1} DAPI for 15 min in the dark at room temperature. At least 250 pollen grains were analyzed for each mutant or the wild type.

Immunolocalization of Highly Methylesterified HG Epitopes

Immunolocalization was performed by cell surface labeling as described previously by Dardelle et al. (2010) or on semithin sections. For the cell surface immunolabeling, pollen grains or pollen tubes in GM were mixed (v/v) with a fixation medium containing 100 mM PIPES buffer, pH 6.9, 4 mM $MgSO_4$•$7H_2O$, 4 mM EGTA, 10% (w/v) Suc, and 5% (w/v) formaldehyde and incubated for 90 min at room temperature. Pollen grains or pollen tubes were rinsed three times by centrifugation with 50 mM PIPES buffer, pH 6.9, 2 mM $MgSO_4$•$7H_2O$, and 2 mM EGTA and three times with phosphate-buffered saline (PBS; 100 mM potassium phosphate, pH 7.4, 138 mM NaCl, and 2.7 mM KCl).

For immunolocalization on semithin sections, dry pollen grains were fixed in ethanol:acetic acid (3:1, v/v) and rinsed in 75% (v/v) ethanol. After centrifugation, the pellet of pollen grains was embedded in a block of 2% (w/v) agarose. The block was then incubated in 75%, 95%, and 100% (v/v) ethanol for 1.5 h each at room temperature. Pollen grains were then transferred in increasing concentrations of methacrylate (25%, 50%, 75%, and 100%) according to Baskin et al. (1992). The resin was polymerized at 4°C for 24 h under UV light. Semithin sections (1 μm) were obtained with the EM UC6 ultramicrotome (Leica) and deposited on poly-L-Lys-coated microscope slides.

Samples were then incubated overnight at 4°C with the LM20 antibody that recognizes methylesterified HG epitopes (Verhertbruggen et al., 2009; diluted 1:5 with PBS + 3% [w/v] milk). Samples were rinsed three times with PBS and incubated for 3 h at 30°C with the secondary antibody, a goat anti-rat IgG (whole molecule)-fluorescein isothiocyanate, diluted 1:100. Controls were carried out by incubation of pollen grains or pollen tubes with the secondary antibody only.

Image Acquisition

Pollen grains and pollen tubes were observed under bright-field and fluorescence illumination on a Leica DLMB microscope equipped with the FDA filter (absorption, 470; emission, 520–560 wavelength) under UV illumination for DAPI and decolorized Aniline Blue staining (absorption, 358; emission, 461 wavelength) or fluorescein isothiocyanate filter (absorption, 490; emission, 520 wavelength). Images were acquired with the Leica DFC300FX camera. Pollen grains and pollen tubes expressing *pPME48::YFP* were observed with a laser scanning confocal microscope (Leica TCS SP2 AOBS). YFP was visualized using the 488-nm laser line of an argon laser with a 510- to 530-nm band-pass filter. Pollen grains were also observed using the Hitachi TM3000 tabletop scanning electron microscope in analytical mode. Time-lapse imaging was performed with the inverted Leica DMI 6000B microscope equipped with the Leica DFC450C camera.

FT-IR Spectroscopy

Eight milligrams of pollen grains from wild-type or mutant plants was collected with the vacuum-pollen method described by Johnson-Brousseau and McCormick (2004). After removing the flower debris with tweezers, pollen grains were placed into microcentrifuge tubes containing 96% ethanol. After several washes, the samples were dried overnight under a fume hood. Pollen grains were then incubated for 1 h in 200 μL of sterilized water at 100°C. After a speed vacuum treatment to eliminate water, samples were oven dried for 48 h to obtain a pectin-enriched fraction. This fraction was stored in a sealed container with silica gel prior to FT-IR analysis. Dry samples were analyzed with an OMNI-Sampler FT-IR spectroscope (version 5.2a) at 4 cm^{-1} resolution. The DM was calculated using the absorbance intensities at 1,630 and 1,740 cm^{-1} assigned to the vibration of carboxyl groups of (1,4)-α-D-GalUA and its methylester form, respectively (Gribaa et al., 2013), using the equation described by Gnanasambandam and Proctor (2000) and Manrique and Lajolo (2002): $DM = A_{1,740}/(A_{1,740} + A_{1,630})$. Commercial pectins with determined DM were used as controls. Using this method, the DM of pectin from citrus (*Citrus*

Downloaded from www.plantphysiol.org on January 27, 2015 - Published by www.plant.org
Copyright © 2015 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

spp.) fruit with 85% DM (Sigma) gave 75.1% ± 2.5% DM, pectin from citrus fruit with 55% to 70% DM (Sigma) gave 60.5% ± 1.5% DM, pectin from citrus fruit with 20% to 30% DM (Sigma) gave 26.9% ± 3.4% DM, and pectate sodium pectin from citrus fruit with DM of 8.6% (Sigma) gave 10.8% ± 0.9% DM. Three biological replicates for the wild type and the mutant were analyzed, and 10 acquisitions were acquired per biological sample.

Protein Extraction and Enzymatic Assay

Total proteins were extracted by grinding 2 mg of dry pollen grains in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.5, 12.5 mM citric acid, 1 M NaCl, 0.2% (w/v) polyvinylpolypyrrolidone, and 0.01% (w/v) Tween 20 plus one tablet of protease inhibitor cocktail (Roche) for one night at 4°C. Cellular fragments were discarded by centrifugation at 10,000*g* for 45 min. The crude protein extract was concentrated by ultrafiltration on Amicon PM10 membranes (Millipore) in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.5. Proteins were quantified by the micromethod of Bradford (1976), with the Bio-Rad kit and bovine serum albumin as a standard. PME activity was measured using the alcohol oxidase method according to Klavons and Bennett (1986). One international unit of PME activity induces the production of 1 μmol of methanol per min.

IEF and Zymography

IEF and zymography were performed as described by Paynel et al. (2014). Briefly, IEF of native proteins was performed on ultrathin polyacrylamide gels with a 6 to 10.5 pH range (Pharmalytes) in 5% acrylamide according to the manufacturer's procedure with the Multiphor II system (LKB Pharmacia). The pH gradient was measured with a contact electrode (pH Inlab 426; VWR International) along a central gel strip. Samples (20 μL) were loaded at the anodic side. After IEF, gels were washed for 15 to 30 min in 20 mM Tris-HCl, pH 8.5, and 5 mM EDTA. Activity of PME was then monitored in gel (zymogram) by using a sandwich of 1% (w/v) citrus pectin with a DM of 85% (Sigma) and 1% (w/v) agar according to Bertheau et al. (1984). The gel was incubated for 1 h at 25°C, and the demethylated pectins resulting from PME activities were precipitated with 0.1 M malic acid and stained with 0.02% (w/v) Ruthenium Red.

Statistical Analysis

Data were statistically treated using the GraphPad software (www.graphpad.com).

Supplemental Data

The following supplemental materials are available.

Supplemental Figure S1. Genomic organization of the *PME48* gene, location of the T-DNA, *PME48* expression in the mutant, and transcript sequence of *PME48*.

Supplemental Figure S2. Viability and phenotypic characteristics of wild-type and mutant lines.

Supplemental Figure S3. Germination rates of wild-type and *pme48−/−* pollen grains in liquid medium.

Supplemental Figure S4. Estimation of the growth speed in liquid medium of wild-type and *pme48−/−* pollen tubes.

Supplemental Table S1. List of primer pairs used for the qRT-PCR analyses.

Supplemental Movie S1. Time-lapse imaging of germination and tube growth of wild-type pollen grains.

Supplemental Movie S2. Time-lapse imaging of germination and tube growth of *pme48−/−* pollen grains.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Research Network Végétal, Agronomie, Sol, et Innovation, PRIMACEN (Regional Platform for Cell Imaging), part of the Institute for Research and Innovation in Biomedicine of the Region Haute-Normandie, and the Fonds Européen de Développement Régional for the use of equipment. We also thank Dr. Claudine Morvan (Polymères, Biopolymères Surfaces, University of Rouen) for help on FT-IR analyses; Gaëlle Lucas and Carole Plasson (Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale, University of Rouen) for technical contributions in molecular biology and plant culture; and Dr. Bert De Rybel and Dolf Weijers (Laboratory of Biochemistry, Wageningen University) for the gift of the pPLV06 plasmid.

Received September 22, 2014; accepted December 16, 2014; published December 18, 2014.

LITERATURE CITED

Abràmoff MD, Magalhães PJ, Ram SJ (2004) Image processing with ImageJ. Biophotonics Int **11:** 36–42

Aouali N, Laporte P, Clément C (2001) Pectin secretion and distribution in the anther during pollen development in *Lilium*. Planta **213:** 71–79

Baskin TI, Busby CH, Fowke LC, Sammut M, Gubler F (1992) Improvements in immunostaining samples embedded in methacrylate: localization of microtubules and other antigens throughout developing organs in plants of diverse taxa. Planta **187:** 405–413

Bertheau Y, Madgidi-Hervan E, Kotoujansky A, Nguyen-The C, Andro T, Coleno A (1984) Detection of depolymerase isoenzymes after electrophoresis or electrofocusing, or in titration curves. Anal Biochem **139:** 383–389

Bethke G, Grundman RE, Sreekanta S, Truman W, Katagiri F, Glazebrook J (2014) Arabidopsis PECTIN METHYLESTERASEs contribute to immunity against *Pseudomonas syringae*. Plant Physiol **164:** 1093–1107

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

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

Bosch M, Hepler PK (2005) Pectin methylesterases and pectin dynamics in pollen tubes. Plant Cell **17:** 3219–3226

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

Bove J, Vaillancourt B, Kroeger J, Hepler PK, Wiseman PW, Geitmann A (2008) Magnitude and direction of vesicle dynamics in growing pollen tubes using spatiotemporal image correlation spectroscopy and fluorescence recovery after photobleaching. Plant Physiol **147:** 1646–1658

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem **72:** 248–254

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

Brummell DA, Harpster MH (2001) Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. Plant Mol Biol **47:** 311–340

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

Castells T, Seoane-Camba JA, Suárez-Cervera M (2003) Intine wall modifications during germination of *Zygophyllum fabago* (Zygophyllaceae) pollen grains. Can J Bot **81:** 1267–1277

Catoire L, Pierron M, Morvan C, du Penhoat CH, Goldberg R (1998) Investigation of the action patterns of pectinmethylesterase isoforms through kinetic analyses and NMR spectroscopy: implications in cell wall expansion. J Biol Chem **273:** 33150–33156

Chebli Y, Geitmann A (2007) Mechanical principles governing pollen tube growth. Funct Plant Sci Biotech **1:** 232–245

Chebli Y, Kaneda M, Zerzour R, Geitmann A (2012) The cell wall of the Arabidopsis pollen tube: spatial distribution, recycling, and network formation of polysaccharides. Plant Physiol **160:** 1940–1955

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

Dardelle F, Lehner A, Ramdani Y, Bardor M, Lerouge P, Driouich A, Mollet JC (2010) Biochemical and immunocytological characterizations of Arabidopsis pollen tube cell wall. Plant Physiol **153:** 1563–1576

Dearnaley JD, Daggard GA (2001) Expression of a polygalacturonase enzyme in germinating pollen of *Brassica napus*. Sex Plant Reprod **13:** 265–271

Denès JM, Baron A, Renard CM, Péan C, Drilleau JF (2000) Different action patterns for apple pectin methylesterase at pH 7.0 and 4.5. Carbohydr Res **327:** 385–393

Downloaded from www.plantphysiol.org on January 27, 2015 - Published by www.plant.org
Copyright © 2015 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

Derksen J, Knuiman B, Hoedemaekers K, Guyon A, Bonhomme S, Pierson ES (2002) Growth and cellular organization of *Arabidopsis* pollen tubes *in vitro*. Sex Plant Reprod **15:** 133–139

De Rybel B, van den Berg W, Lokerse A, Liao CY, van Mourik H, Möller B, Peris CL, Weijers D (2011) A versatile set of ligation-independent cloning vectors for functional studies in plants. Plant Physiol **156:** 1292–1299

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 (Lond) **114:** 1177–1188

Durand C, Vicré-Gibouin M, Follet-Gueye ML, Duponchel L, Moreau M, Lerouge P, Driouich A (2009) The organization pattern of root border-like cells of Arabidopsis is dependent on cell wall homogalacturonan. Plant Physiol **150:** 1411–1421

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-Aho M, Read SM, Bacic A (1998) Location of cellulose and callose in pollen tubes and grains of *Nicotiana tabacum*. Planta **206:** 452–460

Francis KE, Lam SY, Copenhaver GP (2006) Separation of Arabidopsis pollen tetrads is regulated by *QUARTET1*, a pectin methylesterase gene. Plant Physiol **142:** 1004–1013

Fry SC (2011) Cell wall polysaccharide composition and covalent cross-linking. Annu Plant Rev **41:** 1–42

Ge LL, Tian HQ, Russell SD (2007) Calcium function and distribution during fertilization in angiosperms. Am J Bot **94:** 1046–1060

Ge LL, Xie CT, Tian HQ, Russell SD (2009) Distribution of calcium in the stigma and style of tobacco during pollen germination and tube elongation. Sex Plant Reprod **22:** 87–96

Ge W, Song Y, Zhang C, Zhang Y, Burlingame AL, Guo Y (2011) Proteomic analyses of apoplastic proteins from germinating *Arabidopsis thaliana* pollen. Biochim Biophys Acta **1814:** 1964–1973

Geitmann A, Steer M (2006) The architecture and properties of the pollen tube cell wall. In **R Malho**, ed, The Pollen Tube: Plant Cell Monographs, **Vol 3**. Springer-Verlag, Berlin, pp 177–200

Gnanasambandam R, Proctor A (2000) Determination of pectin degree of esterification by diffuse reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. Food Chem **68:** 327–332

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:** 3719–3730

Gribaa A, Dardelle F, Lehner A, Rihouey C, Burel C, Ferchichi A, Driouich A, Mollet JC (2013) Effect of water deficit on the cell wall of the date palm (Phoenix dactylifera 'Deglet nour', Arecales) fruit during development. Plant Cell Environ **36:** 1056–1070

Guan Y, Guo J, Li H, Yang Z (2013) Signaling in pollen tube growth: crosstalk, feedback, and missing links. Mol Plant **6:** 1053–1064

Guénin S, Mareck A, Rayon C, Lamour R, Assoumou Ndong Y, Domon JM, Sénéchal F, Fournet F, Jamet E, Canut H, et al (2011) Identification of pectin methylesterase 3 as a basic pectin methylesterase isoform involved in adventitious rooting in *Arabidopsis thaliana*. New Phytol **192:** 114–126

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

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

Hellens RP, Edwards EA, Leyland NR, Bean S, Mullineaux PM (2000) pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for Agrobacterium-mediated plant transformation. Plant Mol Biol **42:** 819–832

Hepler PK, Kunkel JG, Rounds CM, Winship LJ (2012) Calcium entry into pollen tubes. Trends Plant Sci **17:** 32–38

Holmes-Davis R, Tanaka CK, Vensel WH, Hurkman WJ, McCormick S (2005) Proteome mapping of mature pollen of *Arabidopsis thaliana*. Proteomics **5:** 4864–4884

Hruz T, Laule O, Szabo G, Wessendorp F, Bleuler S, Oertle L, Widmayer P, Gruissem W, Zimmermann P (2008) Genevestigator v3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. Adv Bioinformatics **2008:** 420747

Huang L, Cao J, Zhang A, Ye Y, Zhang Y, Liu T (2009) The polygalacturonase gene *BcMF2* from *Brassica campestris* is associated with intine development. J Exp Bot **60:** 301–313

Iwano M, Shiba H, Miwa T, Che FS, Takayama S, Nagai T, Miyawaki A, Isogai A (2004) Ca^{2+} dynamics in a pollen grain and papilla cell during pollination of Arabidopsis. Plant Physiol **136:** 3562–3571

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

Jiang L, Yang SL, Xie LF, Puah 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

Johnson MA, Lord EM (2006) Extracellular guidance cues and intracellular signaling pathways that direct pollen tube growth. In **R Malho**, ed, The Pollen Tube: A Cellular and Molecular Perspective, **Vol 3**. Springer, Heidelberg, pp 223–242

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:** 2583–2595

Kim J, Shiu SH, Thoma S, Li WH, Patterson SE (2006) Patterns of expansion and expression divergence in the plant polygalacturonase gene family. Genome Biol **7:** R87

Klavons JA, Bennett AD (1986) Determination of methanol using alcohol oxidase and its application to methyl ester content of pectins. J Agric Food Chem **34:** 597–599

Kremers GJ, Goedhart J, van Munster EB, Gadella TW Jr (2006) Cyan and yellow super fluorescent proteins with improved brightness, protein folding, and FRET Förster radius. Biochemistry **45:** 6570–6580

Lennon KA, Lord EM (2000) In vivo pollen tube cell of *Arabidopsis thaliana*. I. Tube cell cytoplasm and wall. Protoplasma **214:** 45–56

Li YQ, Chen F, Linskens HF, Cresti M (1994) Distribution of unesterified and esterified pectins in cell walls of pollen tubes of flowering plants. Sex Plant Reprod **7:** 145–152

Li YQ, Faleri C, Geitmann A, Zhang HQ, Cresti M (1995) Immunogold localization of arabinogalactan proteins, unesterified and esterified pectins in pollen grains and pollen tubes of *Nicotiana tabacum* L. Protoplasma **189:** 26–36

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:** 782–791

Macquet A, Ralet MC, Loudet O, Kronenberger J, Mouille G, Marion-Poll A, North HM (2007) A naturally occurring mutation in an *Arabidopsis* accession affects a β-D-galactosidase that increases the hydrophilic potential of rhamnogalacturonan I in seed mucilage. Plant Cell **19:** 3990–4006

Manrique GD, Lajolo FM (2002) FT-IR spectroscopy as a tool for measuring degree of methyl esterification in pectins isolated from ripening papaya fruit. Postharvest Biol Technol **25:** 99–107

Micheli F (2001) Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. Trends Plant Sci **6:** 414–419

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

Mollet JC, Park SY, Nothnagel EA, Lord EM (2000) A lily stylar pectin is necessary for pollen tube adhesion to an in vitro stylar matrix. Plant Cell **12:** 1737–1750

Mouille G, Ralet MC, Cavelier C, Eland C, Effroy D, Hématy K, McCartney L, Truong HN, Gaudon V, Thibault JF, et al (2007) Homogalacturonan synthesis in *Arabidopsis thaliana* requires a Golgi-localized protein with a putative methyltransferase domain. Plant J **50:** 605–614

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 (Lond) **110:** 383–404

Palanivelu R, Tsukamoto T (2012) Pathfinding in angiosperm reproduction: pollen tube guidance by pistils ensures successful double fertilization. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol **1:** 96–113

Palin R, Geitmann A (2012) The role of pectin in plant morphogenesis. Biosystems **109:** 397–402

Parre E, Geitmann A (2005a) Pectin and the role of the physical properties of the cell wall in pollen tube growth of *Solanum chacoense*. Planta **220:** 582–592

Parre E, Geitmann A (2005b) More than a leak sealant: the mechanical properties of callose in pollen tubes. Plant Physiol **137:** 274–286

Downloaded from www.plantphysiol.org on January 27, 2015 - Published by www.plant.org
Copyright © 2015 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

Paynel F, Leroux C, Surcouf O, Schaumann A, Pelloux J, Driouich A, Mollet JC, Lerouge P, Lehner A, Mareck A (2014) Kiwi fruit PMEI inhibits PME activity, modulates root elongation and induces pollen tube burst in *Arabidopsis thaliana*. Plant Growth Regul **74:** 285–297

Peaucelle A, Braybrook SA, Le Guillou L, Bron E, Kuhlemeier C, Höfte H (2011) Pectin-induced changes in cell wall mechanics underlie organ initiation in *Arabidopsis*. Curr Biol **21:** 1720–1726

Peaucelle A, Louvet R, Johansen JN, Höfte H, Laufs P, Pelloux J, Mouille G (2008) Arabidopsis phyllotaxis is controlled by the methyl-esterification status of cell-wall pectins. Curr Biol **18:** 1943–1948

Phan TD, Bo W, West G, Lycett GW, Tucker GA (2007) Silencing of the major salt-dependent isoform of pectinesterase in tomato alters fruit softening. Plant Physiol **144:** 1960–1967

Qin Y, Chen D, Zhao J (2007) Localization of arabinogalactan proteins in anther, pollen, and pollen tube of *Nicotiana tabacum* L. Protoplasma **231:** 43–53

Qin Y, Leydon AR, Manziello A, Pandey R, Mount D, Denic S, Vasic B, Johnson MA, Palanivelu R (2009) Penetration of the stigma and style elicits a novel transcriptome in pollen tubes, pointing to genes critical for growth in a pistil. PLoS Genet **5:** e1000621

Rafińska K, Świdziński M, Bednarska-Kozakiewicz E (2014) Homogalacturonan deesterification during pollen-ovule interaction in *Larix decidua* Mill.: an immunocytochemical study. Planta **240:** 195–208

Rejón JD, Delalande F, Schaeffer-Reiss C, Carapito C, Zienkiewicz K, de Dios Alché J, Rodríguez-García MI, Van Dorsselaer A, Castro AJ (2013) Proteomics profiling reveals novel proteins and functions of the plant stigma exudate. J Exp Bot **64:** 5695–5705

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

Röckel N, Wolf S, Kost B, Rausch T, Greiner S (2008) Elaborate spatial patterning of cell-wall PME and PMEI at the pollen tube tip involves PMEI endocytosis, and reflects the distribution of esterified and de-esterified pectins. Plant J **53:** 133–143

Roy S, Eckard KJ, Lancelle S, Hepler PK, Lord EM (1997) High-pressure freezing improves the ultrastructural preservation of *in vivo* grown lily pollen tubes. Protoplasma **200:** 87–98

Sénéchal F, Wattier C, Rustérucci C, Pelloux J (2014) Homogalacturonan-modifying enzymes: structure, expression, and roles in plants. J Exp Bot **65:** 5125–5160

Suárez-Cervera M, Arcalis E, Le Thomas A, Seoane-Camba JA (2002) Pectin distribution pattern in the apertural intine of *Euphorbia peplus* L. (Euphorbiaceae) pollen. Sex Plant Reprod **14:** 291–298

Suárez-Cervera M, Asturias JA, Vega-Maray A, Castells T, López-Iglesias C, Ibarrola I, Arilla MC, Gabarayeva N, Seoane-Camba JA (2005) The role of allergenic proteins Pla a1 and Pla a2 in the germination of *Platanus acerifolia* pollen grains. Sex Plant Reprod **18:** 101–112

Tian GW, Chen MH, Zaltsman A, Citovsky V (2006) Pollen-specific pectin methylesterase involved in pollen tube growth. Dev Biol **294:** 83–91

Tieman DM, Handa AK (1994) Reduction in pectin methylesterase activity modifies tissue integrity and cation levels in ripening tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruits. Plant Physiol **106:** 429–436

Van Aelst AC, Van Went JL (1992) Ultrastructural immuno-localization of pectins and glycoproteins in *Arabidopsis thaliana* pollen grains. Protoplasma **168:** 14–19

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:** research0034

Verhertbruggen Y, Marcus SE, Haeger A, Ordaz-Ortiz JJ, Knox JP (2009) An extended set of monoclonal antibodies to pectic homogalacturonan. Carbohydr Res **344:** 1858–1862

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:** 1781–1789

Vogler H, Draeger C, Weber A, Felekis D, Eichenberger C, Routier-Kierzkowska AL, Boisson-Dernier A, Ringli C, Nelson BJ, Smith RS, et al (2013) The pollen tube: a soft shell with a hard core. Plant J **73:** 617–627

Walker M, Tehseen M, Doblin MS, Pettolino FA, Wilson SM, Bacic A, Golz JF (2011) The transcriptional regulator LEUNIG_HOMOLOG regulates mucilage release from the Arabidopsis testa. Plant Physiol **156:** 46–60

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:** 1201–1211

Wen F, Zhu Y, Hawes MC (1999) Effect of pectin methylesterase gene expression on pea root development. Plant Cell **11:** 1129–1140

Western TL, Burn J, Tan WL, Skinner DJ, Martin-McCaffrey L, Moffatt BA, Haughn GW (2001) Isolation and characterization of mutants defective in seed coat mucilage secretory cell development in Arabidopsis. Plant Physiol **127:** 998–1011

Willats WGT, Orfila C, Limberg G, Buchholt HC, van Alebeek GJ, Voragen AG, Marcus SE, Christensen TM, Mikkelsen JD, Murray BS, et al (2001) Modulation of the degree and pattern of methyl-esterification of pectic homogalacturonan in plant cell walls: implications for pectin methyl esterase action, matrix properties, and cell adhesion. J Biol Chem **276:** 19404–19413

Winship LJ, Obermeyer G, Geitmann A, Hepler PK (2010) Under pressure, cell walls set the pace. Trends Plant Sci **15:** 363–369

Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson GV, Provart NJ (2007) An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. PLoS ONE **2:** e718

Wolf S, Mouille G, Pelloux J (2009a) Homogalacturonan methyl-esterification and plant development. Mol Plant **2:** 851–860

Wolf S, Rausch T, Greiner S (2009b) The N-terminal pro region mediates retention of unprocessed type-I PME in the Golgi apparatus. Plant J **58:** 361–375

Zerzour R, Kroeger J, Geitmann A (2009) Polar growth in pollen tubes is associated with spatially confined dynamic changes in cell mechanical properties. Dev Biol **334:** 437–446

Zhang GF, Staehelin LA (1992) Functional compartmentation of the Golgi apparatus of plant cells: immunocytochemical analysis of high-pressure frozen- and freeze-substituted sycamore maple suspension culture cells. Plant Physiol **99:** 1070–1083

Zhang X, Henriques R, Lin SS, Niu QW, Chua NH (2006) Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. Nat Protoc **1:** 641–646

Zhao J, Yang HY, Lord EM (2004) Calcium levels increase in the lily stylar transmitting tract after pollination. Sex Plant Reprod **16:** 259–263

Zhu Y, Zhao P, Wu X, Wang W, Scali M, Cresti M (2011) Proteomic identification of differentially expressed proteins in mature and germinated maize pollen. Acta Physiol Plant **33:** 1467–1474

Downloaded from www.plantphysiol.org on January 27, 2015 - Published by www.plant.org
Copyright © 2015 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

Supplemental data

Table S1. List of primer pairs used for the qRT-PCR analyses.

Primer name	Forward primers	Reverse primers
PPME1	5'-CCAGGATCACACAAAGCCAAG-3'	5'-GAGTTTACAAAGCGGGTGGTG-3'
PME48	5'-AGACTCCCGCACATGACAAGAC-3'	5'-CACTCTCTTGGCTTTGTGTGACC-3'
PME49	5'-AAACACTTCTCCAATGCCAAAGCC-3'	5'-GAAAGCAGCCTTATCGCCGTTG-3'
PME50	5'-CGAAGTTACGCCTTTCCTCACTC-3'	5'-GAGGAGGAAGTAGCCATGTGGA-3'
PME67	5'-TCGATGCTGTCCCTGTTGGTAAC-3'	5'-CGGAATGTGCACTCTCTCCTTG-3'
PME13	5'-GGTCATAAACAAGGAGGAGGCTTT-3'	5'-AGCCTGAGGCACTGATCCAA-3'
PME04	5'-ACAACAGAAGTGTTGCTCTCAGC-3'	5'-AACCTGAACTGTGGCACTGAGG-3'
PME05	5'-TTCCCTTAGTGGCACAGTCCAG-3'	5'-CGTTCACTCTGATAGCCACAGC-3'
PME21	5'-CCATGTCGCATCTTGTGTTCATCG-3'	5'-AGTAGTTTCCAACAATGGCGACAG-3'
PME23	5'-GACCTTCCTAACAGCCACAATCAC-3'	5'-TCCAGCTGTGTTCTCGATTCCG-3'
PME37	5'-ACCGTTCAGGTCGAATCTGAGG-3'	5'-TCCCAATGGACCAGCAGTGTTC-3'
PME43	5'-TCTTCCCGTGAAAGCCAAGAAC-3'	5'-CGCAAACGTCTCGTTCCACTTC-3'
PME45	5'-TGCCAAGTACCAAGGAAGGTACAC-3'	5'-TGTTTCCCGTCACGATCGTCTTC-3'
PME28	5'-GCGAGAATCCACGGGATTTGTTC-3'	5'-ACTGCCAAGTAATCCGGTTCGC-3'
At3g28750	5'-AGGCGATGGTTATTGCACAAGC-3'	5'-TGCCCAACTTAACAGCGAGGTC-3'
At3g57690	5'-AAGAAGATTGCTTGCGGTGTGC-3'	5'-AAAGAGCCAAGAGCTGGCAACG-3'
At5g59370	5'-GCAGATGTGGATTGCGAAAGCAG-3'	5'-CCGTCTTCGTTTGGTGATCTTAGG-3'

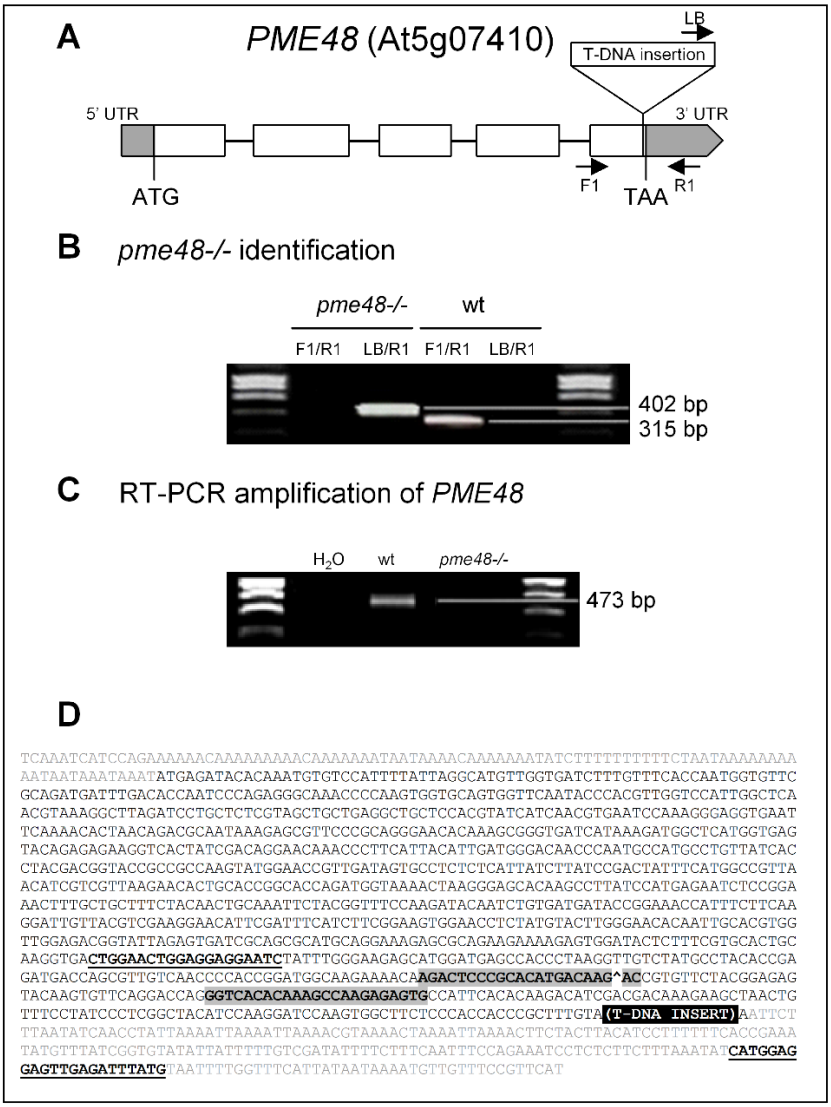


Figure S1. A, Genomic organization of the PME48 (At5g07410) gene and location of the T-DNA insertion of *pme48-/-* mutant line. The white boxes indicate the positions of the exons and the line the position of the introns (both exons and introns are drawn to scale). Grey boxes indicate the untranslated regions (UTR) in 3' and 5'. Primers used for the genotyping are marked with arrows and labelled F1, R1 and LB. B, Amplification of the T-DNA insert in the homozygous *pme48-/-* mutant line. gDNA was extracted from leaves of wild-type and mutant plants. C, RT-PCR amplification products of PME48 mRNA transcripts in 6 h-old pollen tubes from wild-type and *pme48-/-*. D, Transcript sequence of PME48. Primers used for the RT-PCR are in bold and underlined, primers used for the qRT-PCR are highlighted in grey. The T-DNA is located in a black box. Letters in grey are UTR. ^ Location of an intron in the genomic DNA.

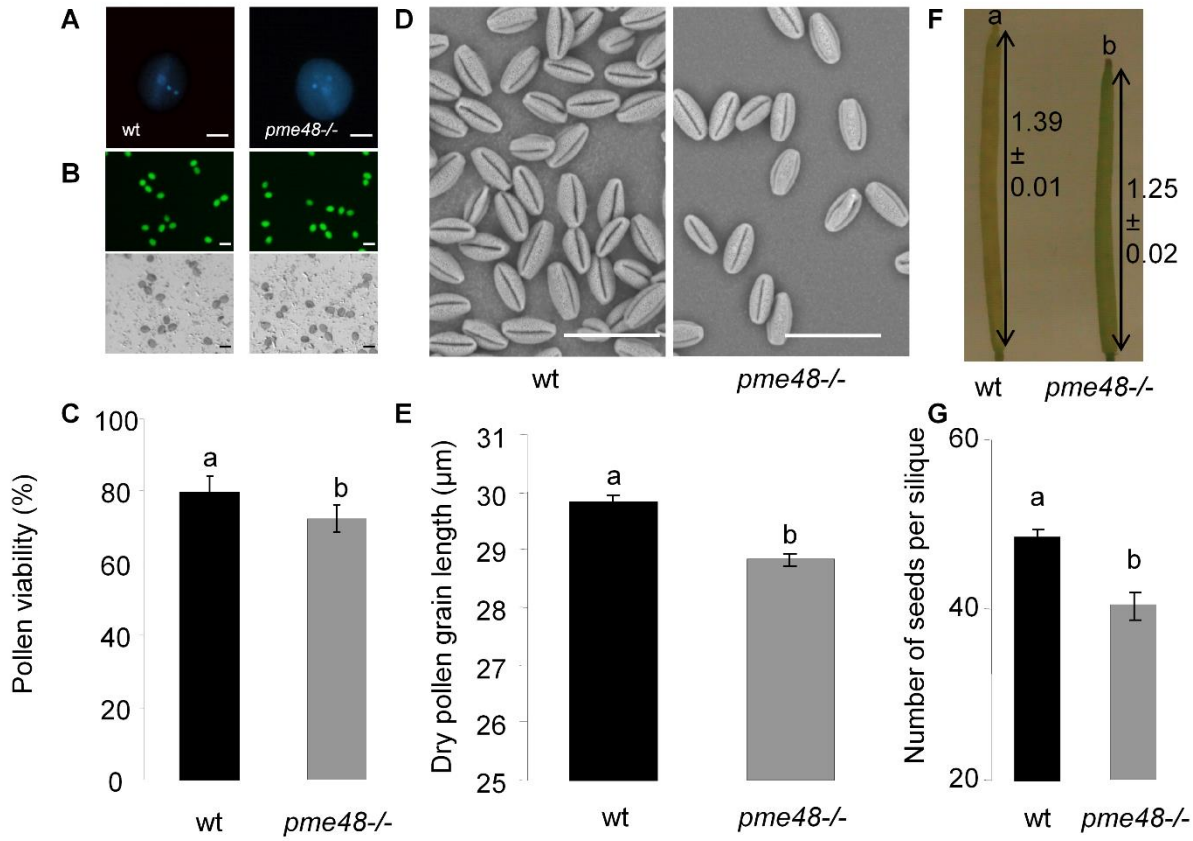


Figure S2. Viability and phenotypic characteristics of wild-type and mutant lines. A, DAPI staining of pollen grains showing the nuclei of the two sperm cells and the vegetative nucleus. Scale bars = 10 µm. B, C, Pollen viability test using FDA. Viable pollen grains fluoresce under UV. Scale bars = 30 µm. D, SEM of wild-type and *pme48-/-* dry pollen grains. Scale bars = 30 µm. E, Measurements of the length of wild-type and *pme48-/-* dry pollen grains. F, G, Quantification of the size of the siliques and the number of seeds per silique in wild-type and *pme48-/-* plants. Different letters indicate statistically significant differences as determined by the Student's t-test ($P<0.0001$). n> 1000 (B,C), n=550 (D,E), n=210 (F,G).

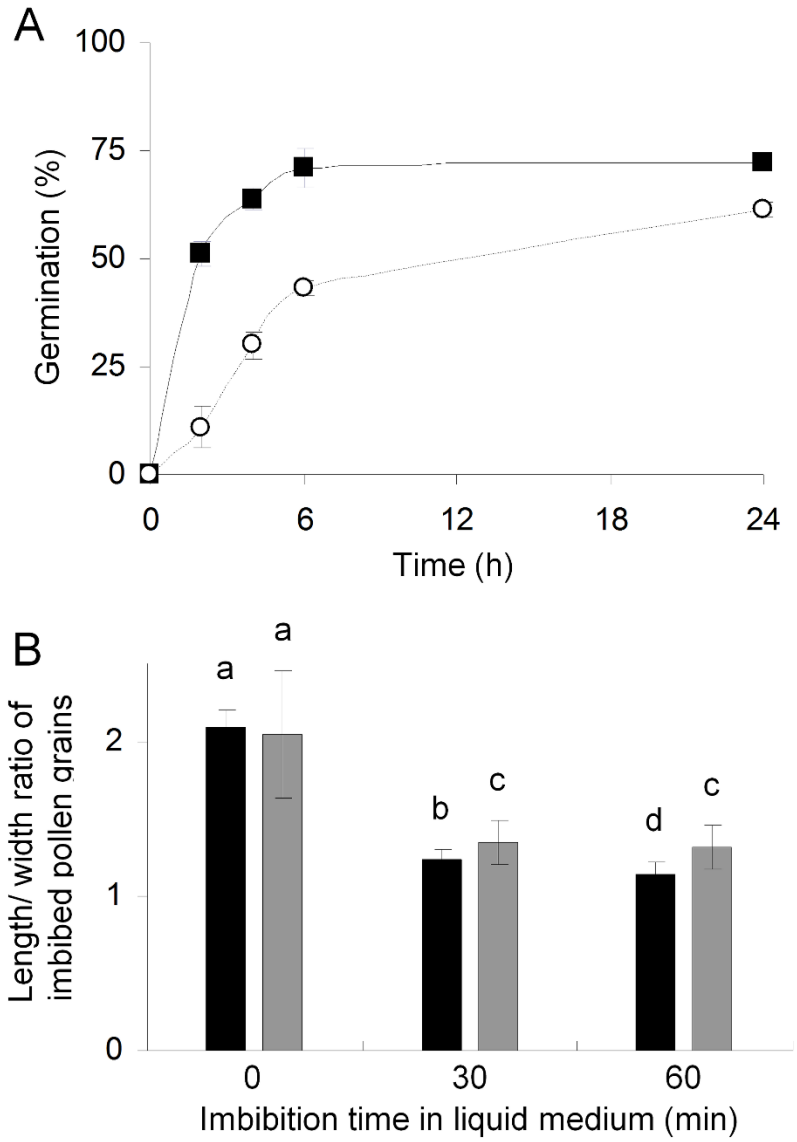


Figure S3. A, Germination rate of wild-type (black square) and *pme48-/-* (white circle) pollen grains in the optimum liquid GM. Pollen grains were considered germinated when the length of the tube was equal to the diameter of the pollen grain. B, Estimation of the imbibition rate by measuring the ratio length/width of wild-type (black bars) and *pme48-/-* (grey bars) pollen grains. Different letters indicate statistically significant differences among the wild-type and *pme48-/-* lines, as determined by the Student's t-test ($P<0.0001$; n >10 000 in A; n>500 in B).

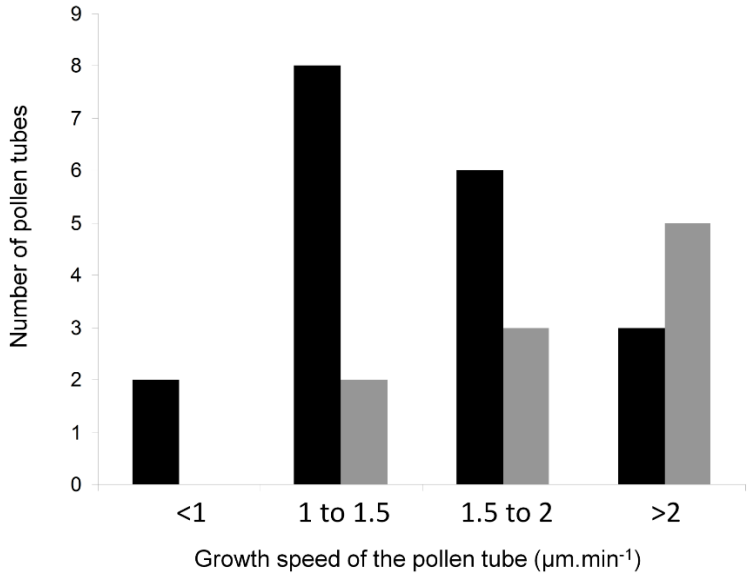


Figure S4. Estimation of the growth speed of wild-type (black bars) and *pme48-/-* (grey bars) pollen tubes in liquid medium.

III. 3. b. Analyse par qRT-PCR des transcrits des 14 *PMEs* spécifiques du pollen chez *pme48-1* :

Afin d'évaluer des possibles phénomènes de compensation d'expression des PMEs chez le mutant, les niveaux d'expression des 14 *PMEs* ont été suivis par PCR quantitative en temps réel dans les grains de pollen mutants secs (Figure 49 A) et imbibés pendant 1 h (Figure 49 B) et dans des tubes polliniques âgés de 6 h (Figure 49 C) cultivés dans un MGL. Afin de visualiser plus facilement les variations d'expression, elles sont présentées sous la forme du ratio : valeur d'expression obtenue pour *pme48-1* divisée par la valeur d'expression obtenue chez le sauvage (partie III. 1. b. Analyse des niveaux d'expression des *PMEs* par RT-qPCR Figure 39).

Hormis la forte sous-expression de *PME48*, il semblerait que les gènes *PPME1* et *PME49* soient aussi légèrement sous-exprimés dans les grains de pollen *pme48-1* secs par rapport au sauvage (Figure 49 A). A ce stade de développement, aucun gène ne semble fortement sur-exprimé. Par contre, dans les grains de pollen *pme48-1* imbibés pendant 1 h, 3 gènes (*PME4*, *PME23* et *PME43*) semblent être sur-exprimés (Figure 49 B). Dans les tubes polliniques, seul *PME5* (*VANGUARD*), le gène le plus exprimé chez le sauvage, semblerait être sur-exprimé (Figure 49 C). Par contre, 10 gènes seraient légèrement sous-exprimés par rapport au sauvage. Il se pourrait donc qu'après

imbibition des grains de pollen, des phénomènes de compensation soient possibles et ils pourraient expliquer le phénotype moins marqué lorsque le pollen mutant est cultivé en MGL.

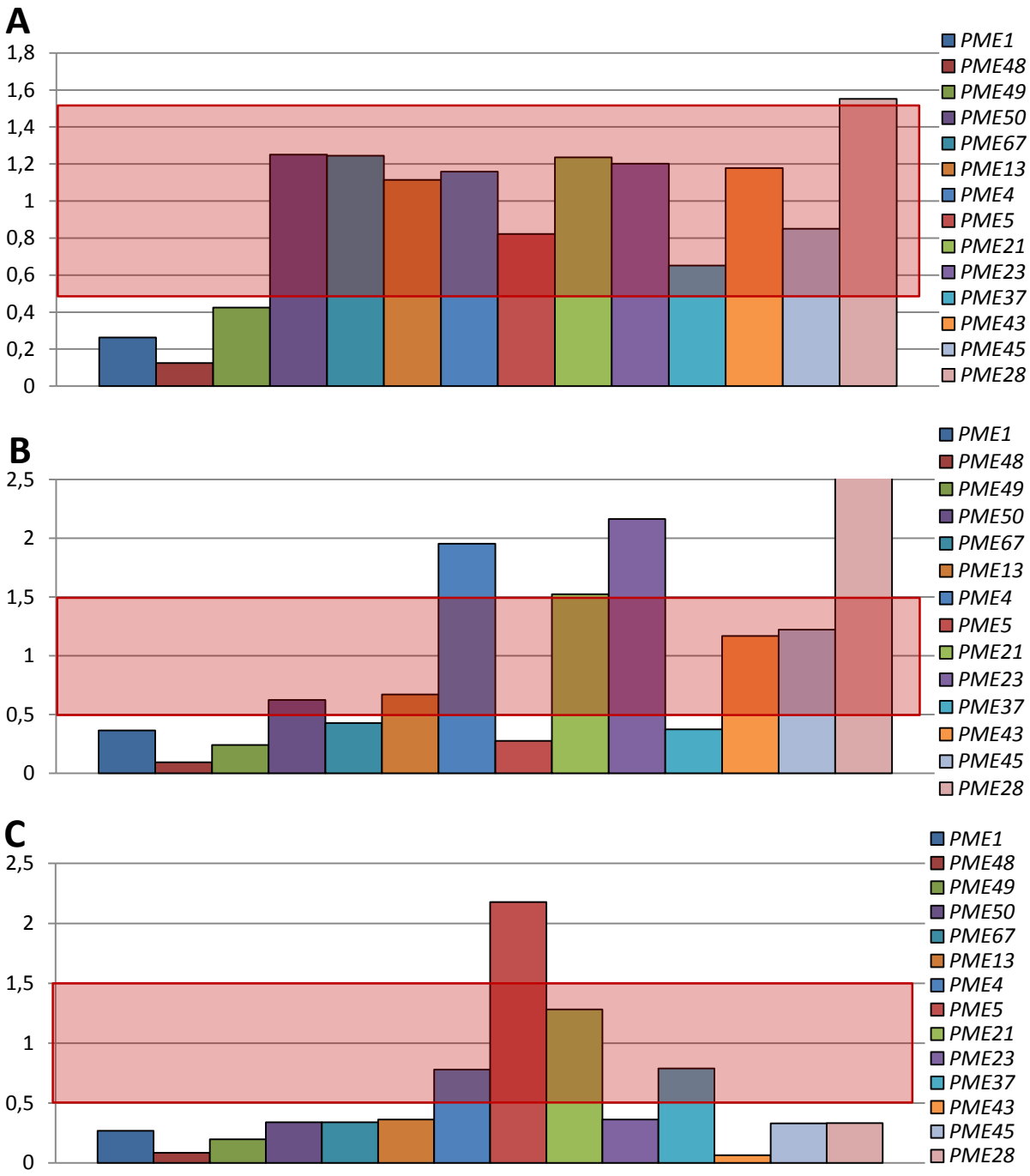


Figure 49 : Expression relative de chaque *PME* chez *pme48-1* (*pme48-1*/sauvage) obtenue par qRT-PCR sur les grains de pollen secs (A), les grains de pollen imbibés durant 1 h (B) et les tubes polliniques cultivés pendant 6 h (C) dans du MGL.
Les valeurs du mutant *pme48-1* sont divisées par celles obtenues chez le WT (A). L'encadré rouge représente la zone de variabilité naturelle (entre 0,5 et 1,5).

III. 4. CARACTERISATION DES MUTANTS HOMOZYGOTES *ppme1*, *pme48-2* ET *pme23-1* :

Afin de mieux apprécier les différences observées, les résultats obtenus avec ces 3 lignées mutantes sont comparés occasionellement avec *pme48-1*.

III. 4. a. Impact de la mutation sur la fécondation et la production de graines :

Croissance *in-vivo* des tubes polliniques mutants :

Des pistils de plantes sauvages ont été isolés par dissection manuelle sous stéréo-microscope et placés à l'abri de toute pollinisation indésirable jusqu'à leur complète maturation (c.à.d. lorsque les papilles du stigmate sont totalement hydratées). Ces pistils sauvages sont ensuite pollinisés manuellement avec des grains de pollen issus de plantes *ppme1*, *pme48-2*, *pme23-1* ou sauvages. Une coloration à l'aniline bleue, après 6 h de croissance des tubes polliniques *in-vivo*, a ensuite été réalisée afin de colorer la callose présente dans la paroi interne des tubes polliniques et dans les bouchons de callose.

Après coloration, on peut observer que les tubes polliniques sauvages ont quasiment atteint les 2/3 de l'ovaire (Figure 50 A). Il en est de même pour les tubes polliniques de *pme23-1* (Figure 50 D). Par contre, la progression des tubes polliniques *ppme1* et *pme48-2* dans le tissu de transmission WT (Figure 50 B-C) est légèrement retardée. Ils ont parcouru environ la moitié du pistil sauvage chez *ppme1* (Figure 50 B).

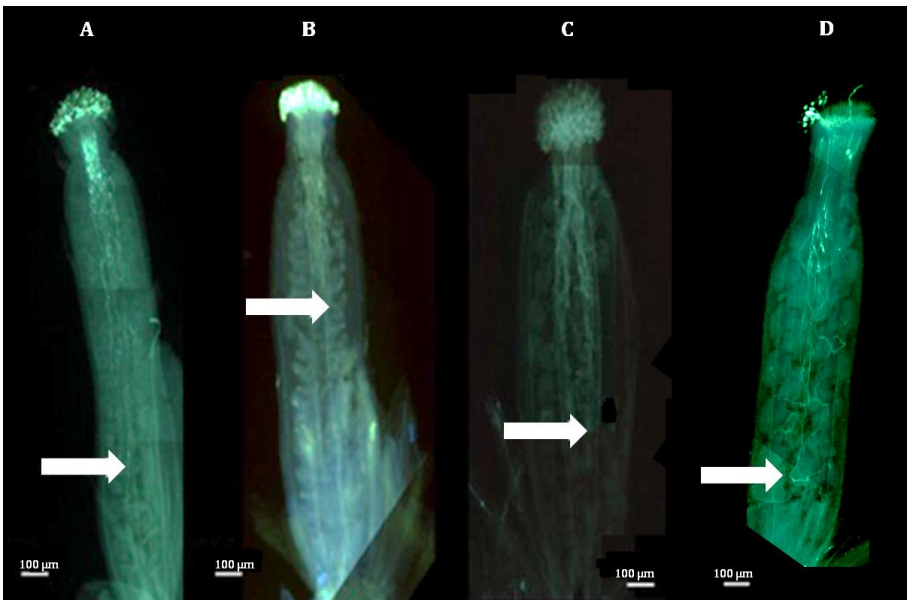
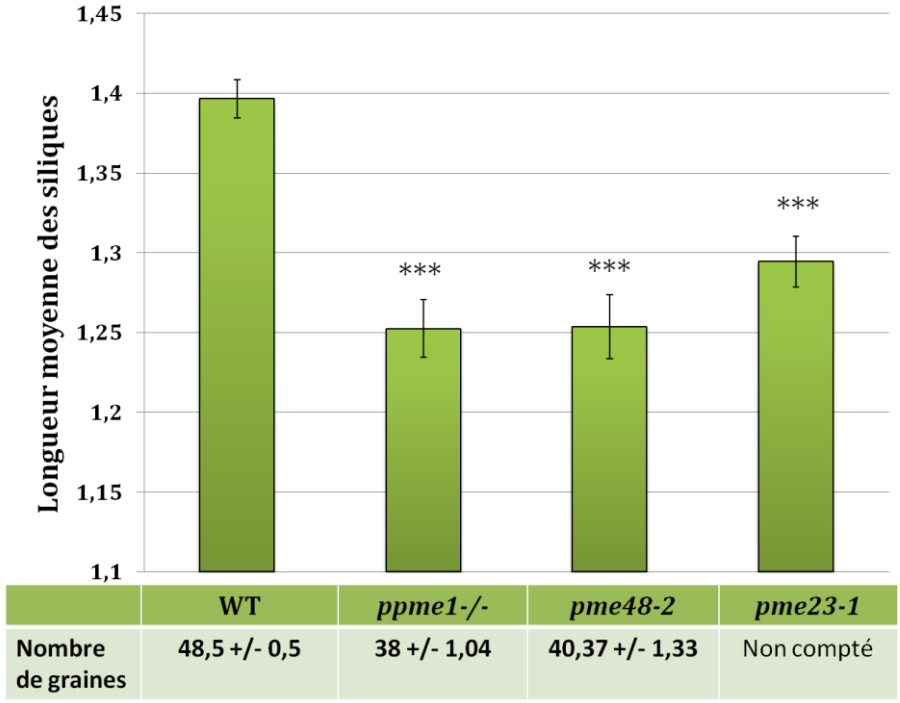


Figure 50 : Comparaison de la progression des tubes polliniques sauvages (A), *ppme1* (B), *pme48-2* (C) et *pme23-1* (D) dans des pistils sauvages, 6 h après la pollinisation manuelle. Les tubes polliniques sont colorés à l'aniline bleue. Les flèches indiquent la distance maximale parcourue par les tubes polliniques.

Cependant, 24 h après la pollinisation manuelle, les tubes polliniques sauvages et mutants *ppme1*, *pme48-2* et *pme23-1* ont tous atteint la base du pistil (résultats non présentés). Il semblerait donc qu'ils aient potentiellement pu féconder la totalité des ovules.

Taille des siliques et production de graines :

Afin de vérifier cette observation, la longueur des siliques et le nombre de graines par silique ont été estimés (Figure 51). La longueur moyenne d'une silique sauvage est de 1,39 ± 0,012 cm. Celle-ci est significativement plus grande que celles des mutants *ppme1, pme48-2* et *pme23-1*, qui sont de 1,25 ± 0,02 cm ; 1,25 ± 0,02 cm et 1,29 ± 0,02 cm, respectivement (Figure 51).



	WT	*ppme1-/-*	*pme48-2*	*pme23-1*
Nombre de graines	48,5 +/- 0,5	38 +/- 1,04	40,37 +/- 1,33	Non compté

Figure 51 : Comparaison de la longueur moyenne (cm) des siliques (Histogramme) et du nombre moyen de graines par silique chez les plantes sauvages et mutantes *ppme1*, *pme48-2* et *pme23-1*. N = 100 siliques/condition, *** (t-test ; p-value<0,0001).

De même, le nombre de graines par silique est significativement plus élevé chez le sauvage avec 48,5 ± 0,5 graines par silique (Figure 51) par rapport aux mutants *ppme1* et *pme48-2* qui contiennent en moyenne 38 ± 1,0 et 40,4 ± 1,3 graines par silique, respectivement.

III. 4. b. Analyses phénotypiques des grains de pollen mutants :

La viabilité des grains de pollen *ppme1* est sensiblement la même que celle du pollen sauvage :

Les tests de viabilité ont montré que la plupart des grains de pollen *ppme1* était viable avec 71,1% ± 5,6 (Figure 52 C et D) mais légèrement moins que les grains de pollen sauvages (79,0% ± 4,6) (Figure 52 A et B).

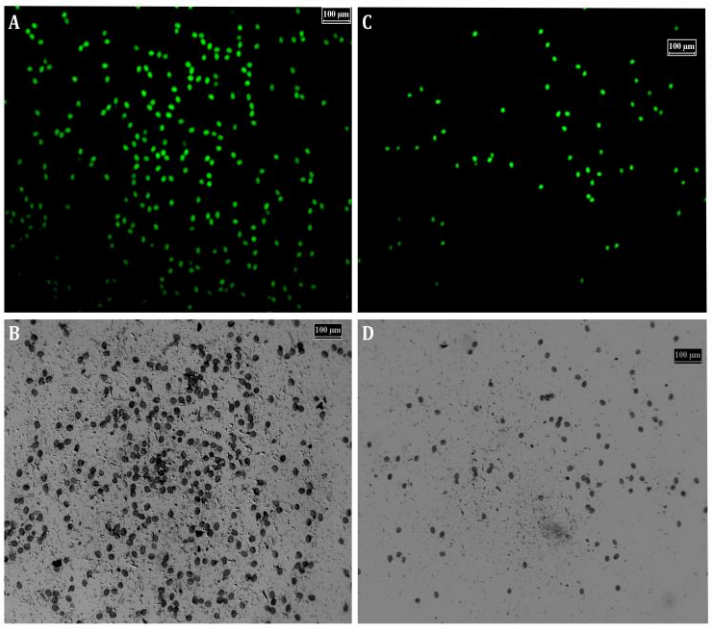


Figure 52 : Photographies des grains de pollen sauvages (A, B) et mutants *ppme1*(C, D), après coloration à la FDA, en lumière transmise (B, D) et sous UV (A, C).
La barre d'échelle est de 100 µm.

Le nombre de noyaux dans les grains de pollen mutants est conforme à celui du pollen sauvage :

Le pollen d'*A. thaliana* étant de type trinucléé (c.à.d. que la seconde mitose se déroule dans les anthères avant la libération des grains de pollen), la coloration au DAPI a permis de mettre en évidence les deux noyaux des cellules spermatiques (cercles rouges) et celui du noyau végétatif (cercle jaune) chez les grains de pollen sauvages (Figure 53 A) et ceux des mutants *ppme1* (Figure 53 B), *pme48-2* (Figure 53 C) et *pme23-1* (Figure 53 D).

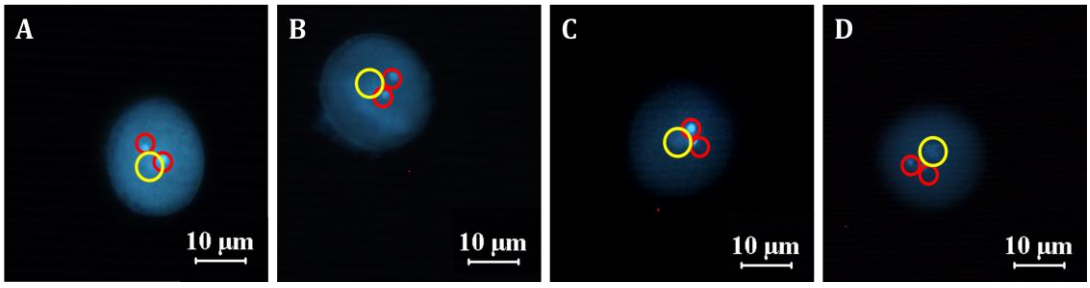


Figure 53 : Coloration au DAPI de grains de pollen sauvages (A) et mutants : *ppme1* (B), *pme48-2* (C) et *pme23-1* (D).
Cercle jaune : noyau végétatif ; cercles rouges : noyaux des cellules spermatiques. Barre d'échelle de 10 µm.

La longueur des grains de pollen secs est plus petite chez les mutants :

La longueur des grains de pollen secs a également été mesurée afin de vérifier si les grains de pollen mutants présentent une taille normale (Figure 54).

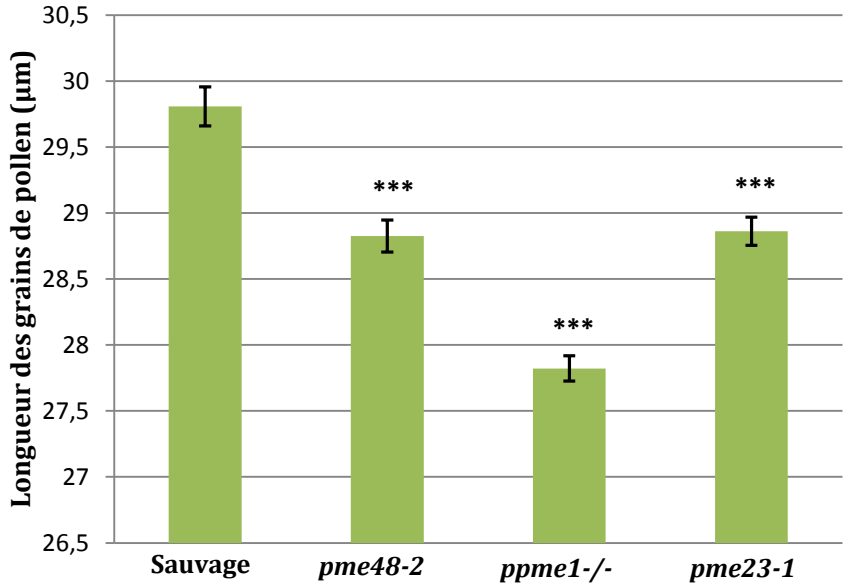


Figure 54 : Comparaison de la longueur moyenne des grains de pollen secs sauvages avec celle des grains de pollen secs mutants *pme48-2*, *ppme1* et *pme23-1*.
*** (t-test ; p-value<0,0001).

La longueur moyenne des grains de pollen secs sauvages (n= 142 grains de pollen) était de 29,8 ± 0,15 µm. Chez les mutants, la longueur moyenne des grains de pollen secs *pme48-2* (n= 141 grains de pollen) était de 28,8 ± 0,12 µm, *pme23-1* (n= 222 grains de pollen) de 28,9 ± 0,10 µm et *ppme1* (n= 198 grains de pollen) de 27,8 ± 0,11 µm. Les analyses statistiques indiquent que la différence entre le pollen sauvage et les pollens mutants était très fortement significative.

Les grains de pollen mutants présentent un retard de germination *in-vitro* dépendant du type de milieu de culture :

Les cinétiques de germination des grains de pollen issus des mutants *ppme1*, *pme48-2* et *pme23-1* ont été étudiées *in-vitro* en MGL (Figure 55) ou sur MGS (Figure 56).

En MGL, le taux de germination des grains de pollen sauvages a atteint 50% après 2 h de culture, tandis que celui des mutants n'a atteint que 10%. Après 6 h de

culture, 70,9% ± 4,6 des grains de pollen sauvages ont germé, alors que les grains de pollen mutants n'ont pas atteint les 50% de germination (soit une diminution de près de 30%). Ces réductions de germination du pollen sont statistiquement significatives (Figure 55). Par contre, les taux de germination entre les différentes lignées mutantes sont assez similaires.

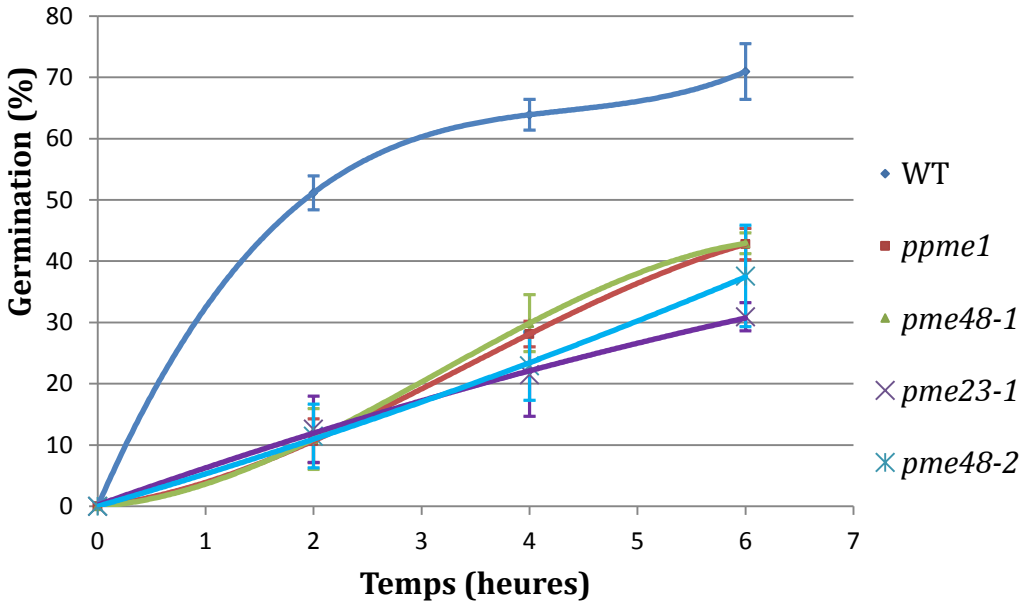


Figure 55 : Cinétique de germination des grains de pollen sauvages et mutants cultivés *in-vitro* en MGL.
N= 3421 grains de pollen sauvages ; 7822 grains de pollen *ppme1*, 7177 grains de pollen *pme48-1*, 2658 grains de pollen *pme23-1* et 1586 grains de pollen *pme48-2*.

Sur MGS, après 2 h de culture, 10% des grains de pollen sauvages ont germé (Figure 56). Ces 10% de germination ne sont pas atteints avant 11 h chez *ppme1* et 24 h chez *pme48-1* et *pme48-2*. Après 8 h de culture, plus de 70% du pollen sauvage a germé alors que moins de 5% de germination est observée chez les mutants dont l'expression de la PME du groupe I est altérée : *ppme1* (2,9% ± 2,2 de germination). Les pourcentages de germination de *pme48-1* et *pme48-2* sont identiques : 3,2% ± 1,3. Seul le mutant dont la PME est du groupe II, *pme23-1*, semble rattraper son retard (Figure 56, violet). En effet, après 6 h de culture 38% des grains de pollen avaient germé mais après 24 h, les taux étaient quasiment identiques à ceux obtenus chez le pollen sauvage.

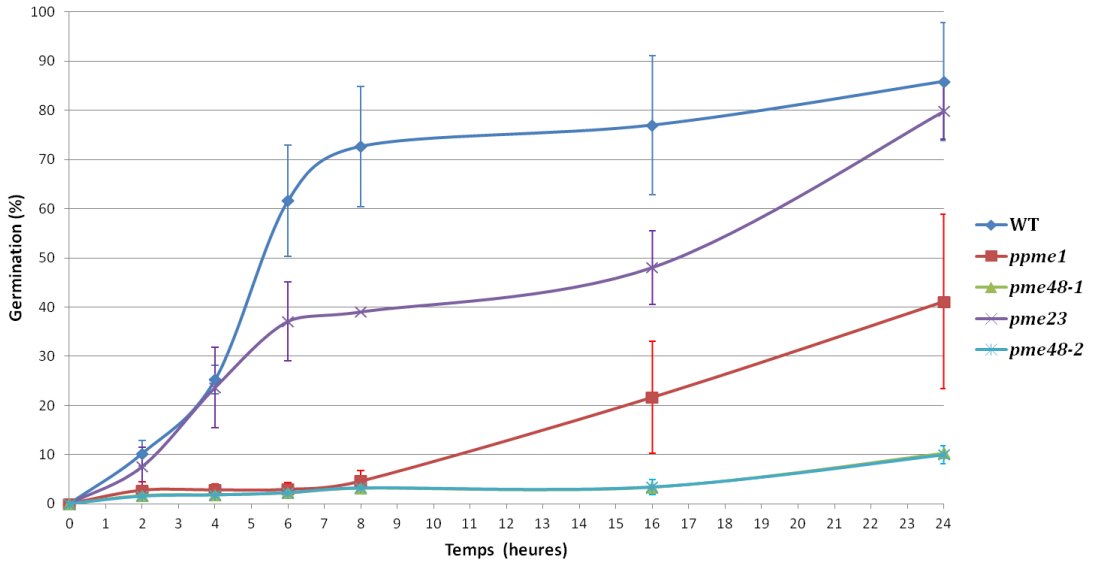


Figure 56 : Cinétique de germination des grains de pollen sauvages et mutants cultivés *in-vitro* sur MGS.
Les courbes de *pme48-1* et *pme48-2* sont confondues. N= 38136 grains de pollen sauvages ; 30663 grains de pollen *ppme1*, 24715 grains de pollen *pme48-1*, 11324 grains de pollen *pme48-2* et 12321 grains de pollen *pme23-1*.

En comparant les résultats obtenus en MGL avec ceux sur MGS, il apparaît donc que les grains de pollen des mutants *pme48-1* et *pme48-2* sont plus affectés par l'alteration de l'expression de la PME48 que ne le sont *pme23-1* et *ppme1* (Figure 55 et Figure 56). En particulier chez *pme23-1*, le pourcentage final de germination après 24 h est semblable à celui du sauvage sur MGS.

Les tubes polliniques des mutants *pme48*, *ppme1* et *pme23* sont instables :

En plus des faibles taux de germination, le mutant *ppme1* présente des phénotypes remarquables comme montré sur les images obtenues par vidéo pendant la germination des grains de pollen et la croissance des tubes polliniques (Figure 57).

Morphologie des tubes polliniques : un taux important de difformités est observé chez les tubes polliniques mutants. Pendant la culture en MGL, les tubes polliniques présentent des dichotomies et plusieurs tubes polliniques émergent des apertures d'un seul grain de pollen (Figure 57 ; cercle rouge). De même, un taux important de tubes éclatés est observé (Figure 57, étoiles ; Figure 58). Des phénotypes similaires avaient été observés chez le mutant *pme48-1* précédemment décrit.

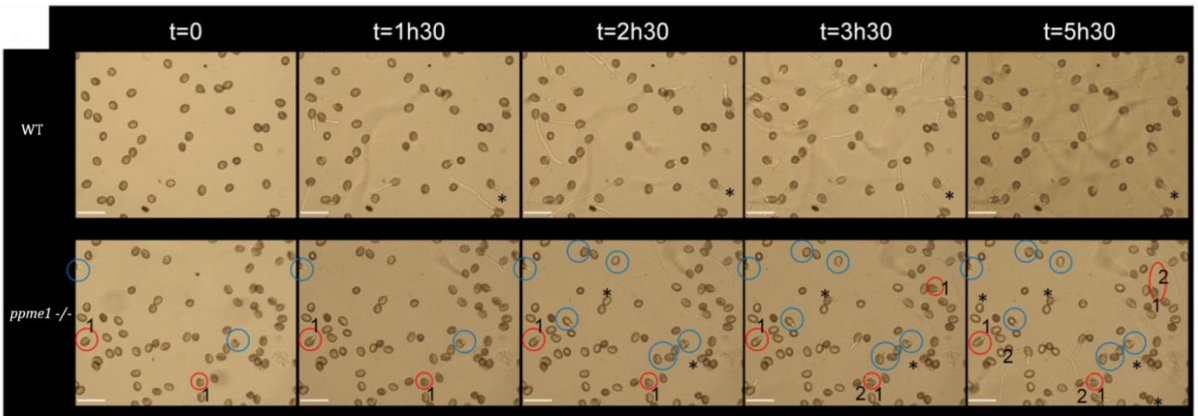


Figure 57 : Photographies par *time lapse* de grains de pollen sauvages et *ppme1* cultivés en MGL. (*) Tubes polliniques éclatés, (cercle rouge) deux tubes polliniques émergeant d'un même grain de pollen et (cercle bleu) des tubes polliniques ayant arrêté leurs croisssances.

Plus de 30% d'éclatement sont observés chez les tubes polliniques de *pme48-1* après 6 h de culture (soit trois fois plus que le sauvage). Pour les autres mutants étudiés, ces taux s'approchent de 20%, soit presque deux fois plus que pour les tubes polliniques sauvages (Figure 58).

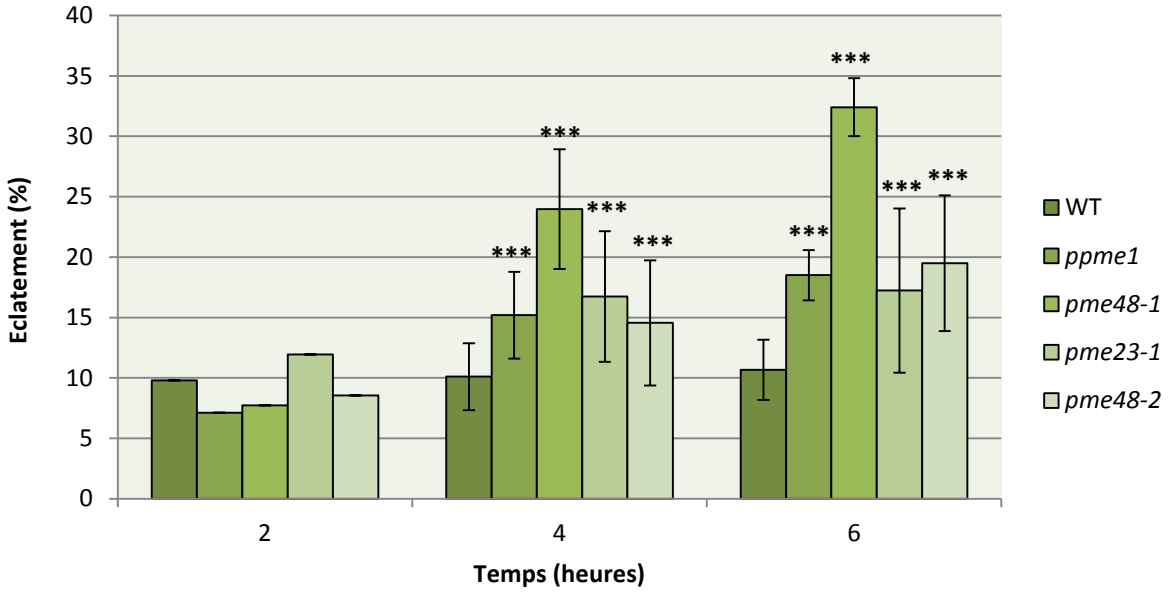


Figure 58 : Cinétique d'éclatement des tubes polliniques cultivés en MGL chez le sauvage (WT) et les mutants *ppme1*, *pme48-1*, *pme48-2* et *pme23-1*.
*** : *t-test p-value* < 0,0001).

L'imbibition des grains de pollen *ppme1* est perturbée :

Comme les grains de pollen *ppme1* présentent un délai de germination, la vitesse d'imbibition des grains de pollen a été évaluée en calculant le rapport longueur /

largeur du grain de pollen. Les grains de pollen secs ont des formes ellipsoïdales et la longueur est d'environ deux fois la largeur. Au cours de l'imbibition, les grains de pollen deviennent sphériques et la longueur est à peu près égale à la largeur, le rapport longueur / largeur est alors ~ 1. Cette analyse a été réalisée sur des grains de pollen cultivés sur MGS (Figure 59 A) et en MGL (Figure 59 B).

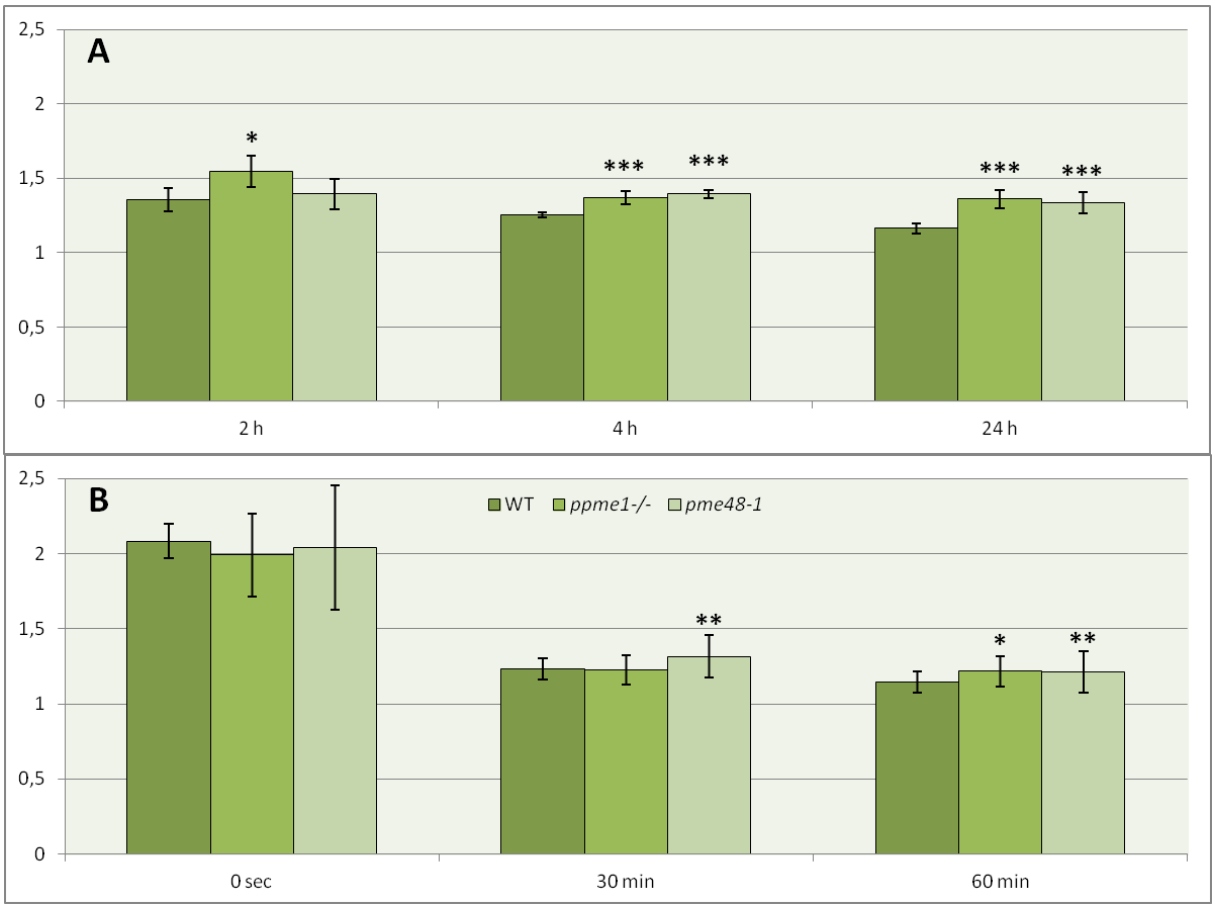


Figure 59 : Cinétique d'imbibition des grains de pollen sauvages et mutants *ppme1* et *pme48-1* cultivés sur MGS (A) ou dans du MGL (B).
*: (*t-test p-value* <0,01), **: (*t-test p-value* <0,001), ***: (*t-test p-value* <0,0001).

Après 2, 4 et 24 h de culture sur MGS, les grains de pollen *ppme1* étaient moins imbibés que les grains de pollen sauvages (Figure 59 A). Après 4 h de culture, la valeur moyenne obtenue pour les grains de pollen sauvages était de 1,25 ± 0,01 contre 1,37 ± 0,04 pour *ppme1*. Les tests statistiques indiquent que les différences sont extrêmement significatives comparées au sauvage (p-value <0,0001). Après 24 h de culture sur MGS, la valeur moyenne du ratio pour les grains de pollen sauvages était de 1,16 ± 0,33 tandis qu'elle était de 1,36 ± 0,06 pour *ppme1* (Figure 59 A). En revanche, les différences observées entre *ppme1*et *pme48-1* ne sont pas significatives.

De même, la cinétique d'imbibition en MGL (Figure 59 B) indique que les différences observées entre les grains de pollen sauvages et les grains de pollen mutants commencent à être significatives au bout de 30 min pour *pme48-1* et à partir de 1 h pour *ppme1* (Figure 59 B). Ces résultats indiquent que l'imbibition des grains de pollen issus des plantes mutantes *ppme1* est perturbée et pourrait donc expliquer la réduction significative de la germination des grains de pollen.

Les taux de germination des grains de pollen *ppme1* sont améliorés en augmentant la concentration en $CaCl_2$ dans le MG :

Comme présenté dans l'article III. 3. CARACTERISATION DU MUTANT HOMOZYGOTE *pme48-1* : une augmentation de la concentration en $CaCl_2$ à 7,5 mM est capable de restaurer le phénotype du mutant *pme48-1*. Une approche identique a été utilisée pour les mutants *ppme1* et *pme23-1*. Une augmentation de la concentration en $CaCl_2$ à 7,5 mM (Figure 60 A, B) et 10 mM de $CaCl_2$ (Figure 60 C, D) dans le MGL (Figure 60 A, C) et MGS (Figure 60 B, D), a été testée sur les pourcentages de germination et d'éclatement des tubes polliniques sauvages et mutants cultivés jusqu'à 24 h.

Sans surprise, les grains de pollen sauvages préfèrent le milieu de germination optimum mis au point par Boavida et McCormick (2007). Dans les milieux supplémentés en $CaCl_2$, les taux de germination après 24 h restent stables mais les taux d'éclatement des tubes polliniques sont considérables, quasiment 80-90% des grains de pollen germés.

Comme pour le mutant *pme48-1*, les pourcentages de germination sont améliorés pour le pollen mutant *ppme1*. Après 24 h de culture que ce soit en MGL (Figure 60 A, C) ou sur MGS (Figure 60 B, D), ils atteignent plus de 80% comme chez le sauvage. Après 24 h de culture en MGS optimum, le taux était de 40% (Figure 56). Par contre, la concentration à 10 mM provoque une nette augmentation des taux de tubes polliniques éclatés (Figure 60 C-D). Ce phénomène est nettement réduit à la concentration de 7,5 mM.

Chez le mutant *pme23-1*, les effets sur la germination ne sont pas aussi spectaculaires. En milieu optimum, les pourcentages de germination étaient de l'ordre de 40% en MGL (Figure 55) et MGS (Figure 56) après 6 h de culture. Ces pourcentages restent inchangés dans les MG contenant 10 mM de $CaCl_2$ (Figure 60 C-D).

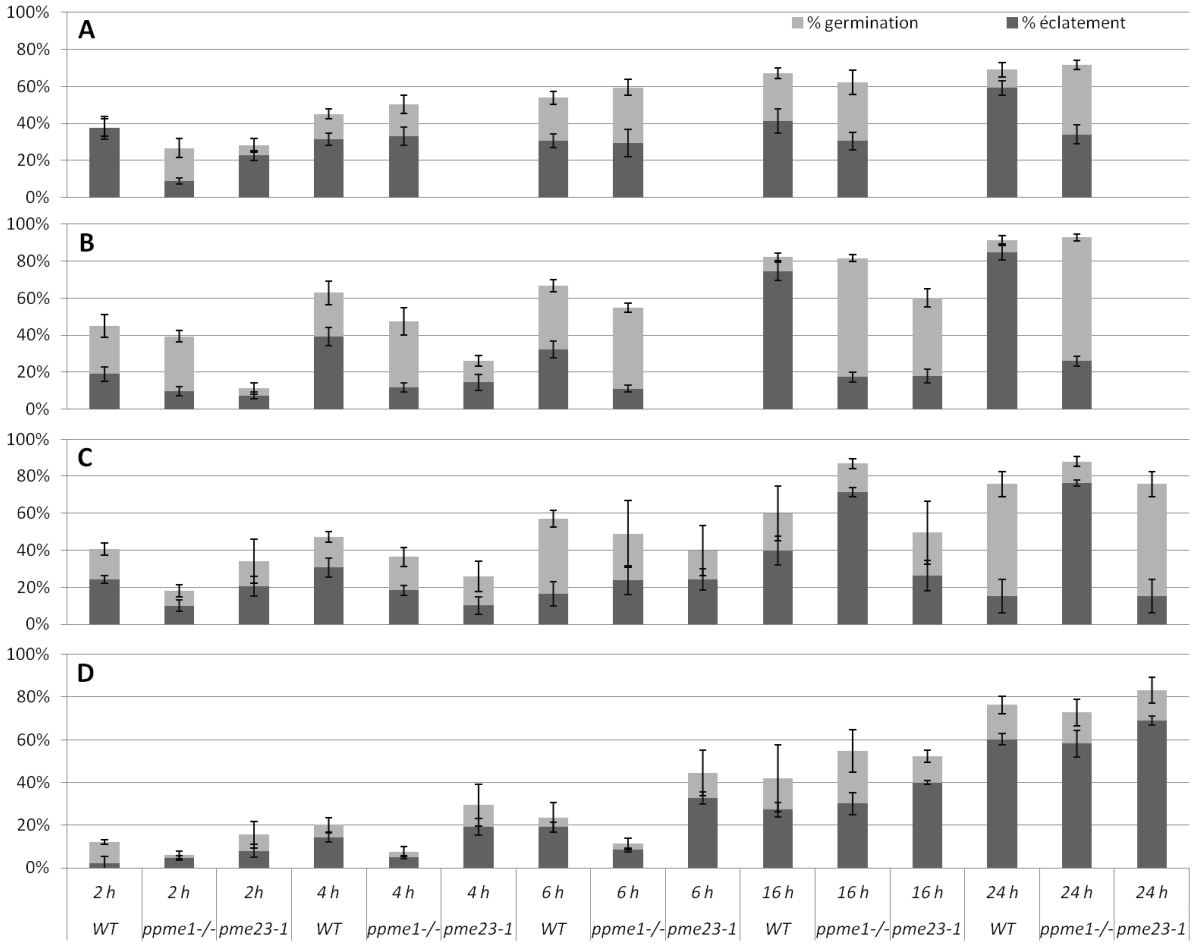


Figure 60 : Cinétique de germination et d'éclatement des grains de pollen sauvages et mutants (*ppme1* et *pme23-1*) cultivés *in-vitro* dans du MGL (A, C) ou sur MGS (B, D) dont la concentration en $CaCl_2$ est de 7,5 mM (A, B) ou de 10 mM (C, D).

III. 4. c. Etudes immunocytochimiques des grains de pollen et des tubes polliniques *ppme1* et *pme23-1* :

Immunomarquages des HGs fortement méthyl-estérifiés avec LM20 :

Des immunomarquages de surface des épitopes associés aux HGs fortement méthyl-estérifiés ont été réalisés sur les grains de pollen et les tubes polliniques à l'aide des anticorps monoclonaux JIM7 et LM20, tandis que les épitopes associés aux HGs faiblement méthyl-estérifiés ont été marqués avec les anticorps monoclonaux JIM5 et LM19 (Figure 61).

L'immunolocalisation des HGs fortement méthyl-estérifiés à l'aide des anticorps JIM7 et LM20 a révélé que les épitopes sont presque exclusivement limités à la région

apicale des tubes polliniques sauvages (Figure 61). Les tubes polliniques de *ppme1* et *pme48-1* sont marqués sur toute la longueur mais avec une plus forte intensité de fluorescence au niveau des apex. Chez *pme23-1*, le marquage semble plus uniforme.

Avec JIM5 ou LM19, on observe un marquage plus ou moins uniforme tout le long du tube pollinique avec une nette diminution de la fluorescence dans la partie apicale (Figure 61). Pour une même durée d'exposition, la fluorescence apparaît plus intense chez le mutant *ppme1* que chez le sauvage (Figure 61).

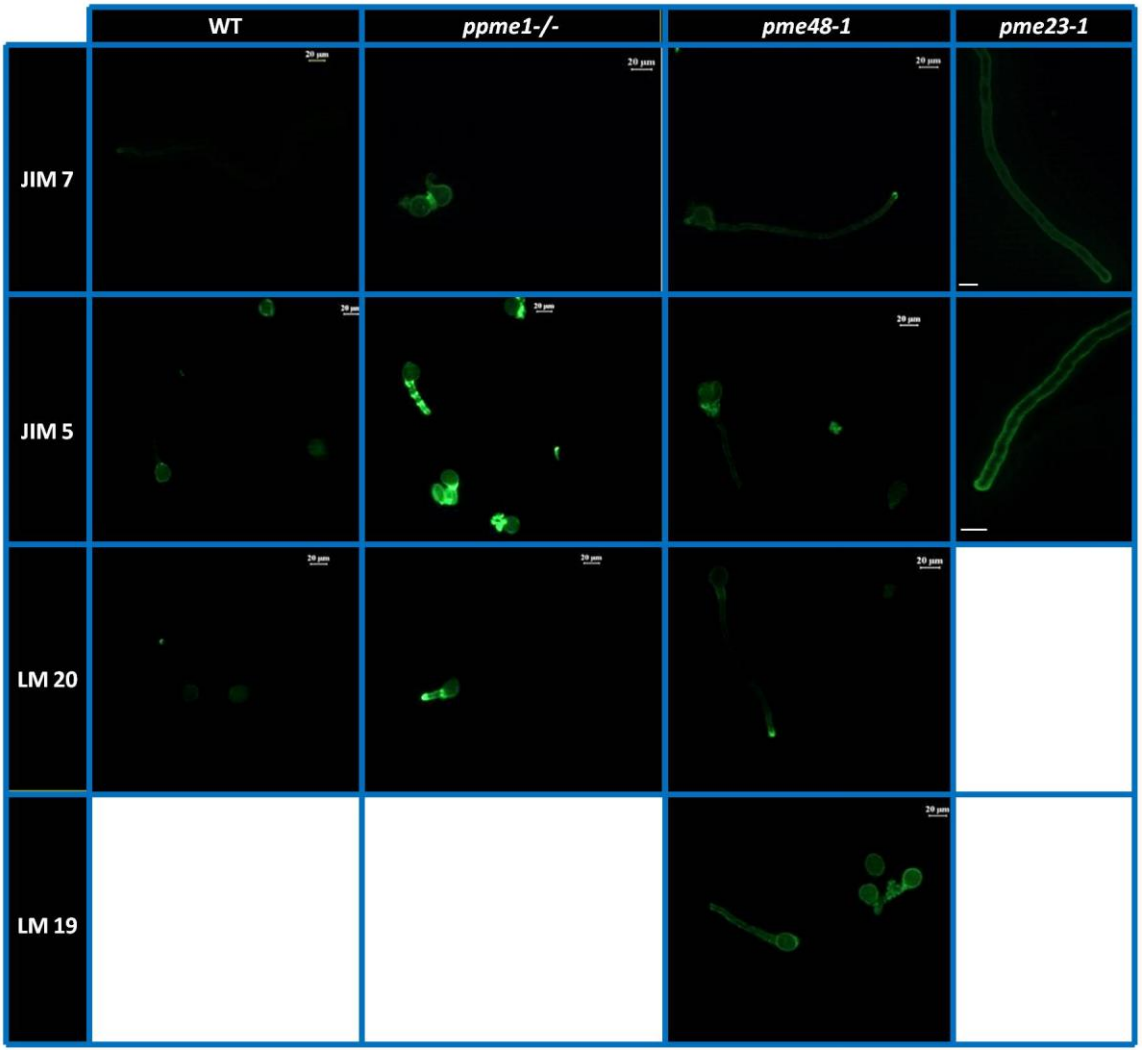


Figure 61 : Immunomarquages de surface des épitopes associés aux HGs fortement méthyl-estérifiés avec JIM7 et LM20, ou faiblement méthyl-estérifiés avec JIM5 et LM19, sur des grains de pollen et tubes polliniques sauvages (WT) et mutants (*ppme1*; *pme48-1* et *pme23-1*). Les barres d'échelles sont de 20 µm.

LM19 et LM20 présentent des capacités de marquage des HGs avec différents niveaux de méthylestérification qui se chevauchent sauf pour les épitopes d'HGs totalement dé-méthyl-estérifiés qui ne sont reconnus que par LM19 (Verhertbruggen *et*

al., 2009). Par conséquent, ces résultats suggèrent que la teneur en épitopes associés aux HGs plus fortement méthyl-estérifiés est plus élevée chez *ppme1* et *pme23-1* par rapport au sauvage.

Des analyses biochimiques complémentaires, comme réalisées sur *pme48-1*, devraient permettre de confirmer ou d'infirmer ces observations.

III. 4. d. Analyse par qRT-PCR des transcrits des 14 *PME*s chez *ppme1*:

Afin de connaître plus précisément les niveaux d'expression des 14 gènes *PME*s chez *ppme1*, une étude complémentaire par PCR quantitative en temps réel a été entreprise sur les grains de pollen mutants secs et imbibés pendant 1 h dans un milieu liquide ainsi que dans des tubes polliniques âgés de 6 h, et les résultats obtenus ont été divisés par ceux obtenus pour le sauvage (Figure 62 A-C).

A la différence de *pme48-1* (Figure 49 A), deux gènes codant pour PME50 et PME28 sont sur-exprimés chez *ppme1* dans les grains de pollen secs (Figure 62 A). Après 1 heure d'imbibition, comme chez *pme48-1* (Figure 49 B), *PME28* est sur-exprimé (Figure 62 B). Dans les tubes polliniques, *PME5* ainsi que *PME21* semblent aussi sur-exprimés (Figure 62 C).

Le niveau d'expression du gène *PPME1,* assez proche de 0,5 provient de l'amplification des ARN provenant d'une portion du gène, mais ne correspond en aucun cas à l'expression de la PPME1.

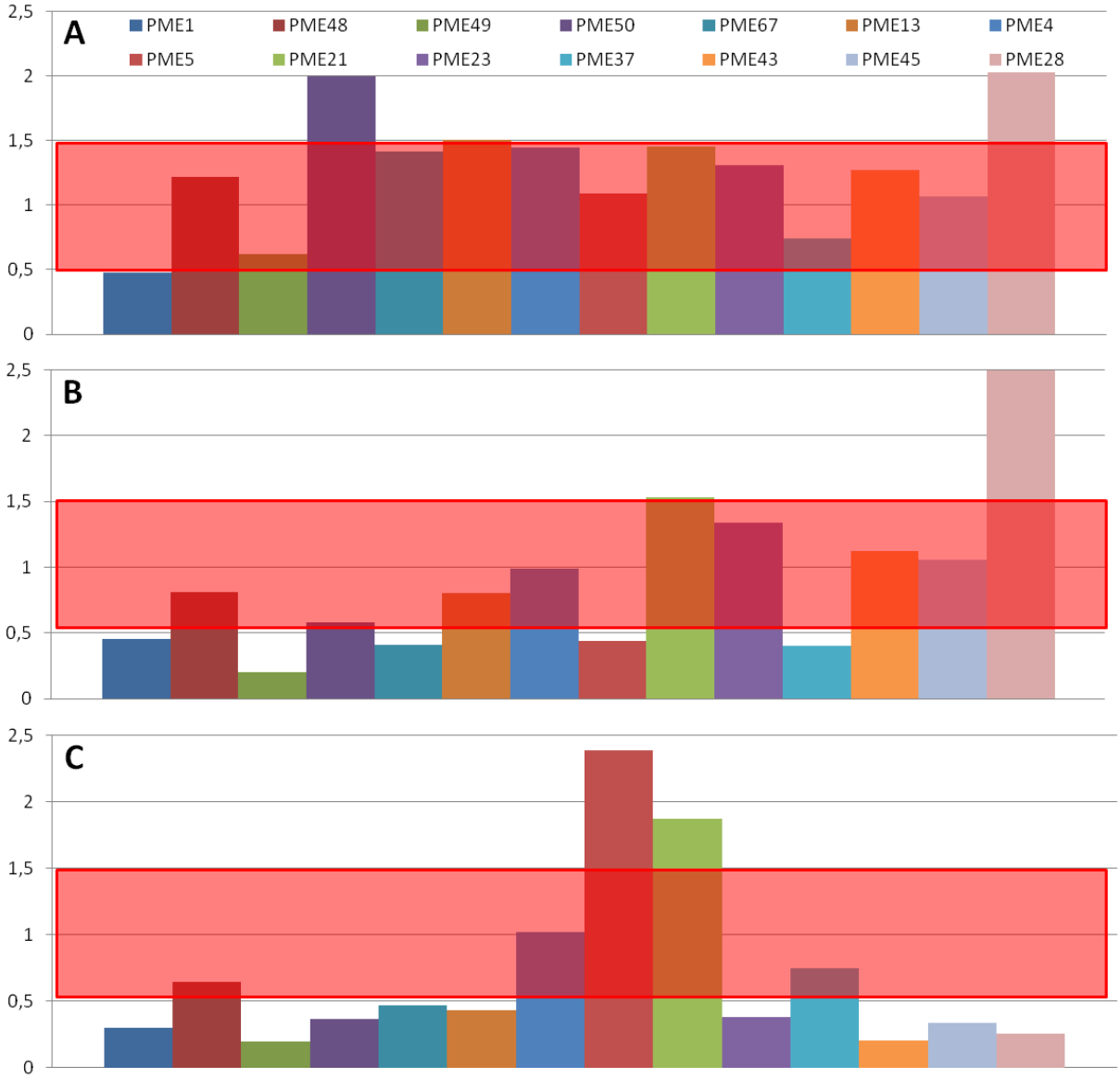


Figure 62 : Expression relative des 14 *PMEs* chez *ppme1* obtenue par qRT-PCR sur les grains de pollen secs (A), les grains de pollen imbibés durant 1 h (B) et les tubes polliniques cultivés pendant 6 h (C) dans du MGL.
L'encadré rouge représente la zone de variabilité naturelle (entre 0,5 et 1,5).

III. 5. EFFET DE L'AJOUT EXOGENE DE PME ET PMEI SUR LA GERMINATION ET LA CROISSANCE DES TUBES POLLINIQUES :

III. 5. a. Utilisation de la PME d'orange :

L'effet de l'ajout exogène de PME sur la germination et la croissance des tubes polliniques sauvages a été testé en utilisant la PME commerciale d'orange à une concentration finale variant de 0.01 à 20 $U.mL^{-1}$ en MGL. Cette PME est une PME à activité processive dont la séquence protéique de son domaine catalytique a été alignée avec les domaines catalytiques des PME48 et PPME1 (Annexe I. b).

Les pourcentages de germination et d'éclatement des tubes ont été calculés chez le sauvage (Figure 63 A), *ppme1* (Figure 63 B) et *pme48-1* (Figure 63 C) après 6 h de culture dans du MGL.

Les grains de pollen sauvages germent mieux en condition classique, c.à.d. sans PME d'orange (Figure 63 A). Lorsque l'on ajoute des quantités croissantes de PME d'orange dans le MGL, les taux de germination des grains de pollen sauvages diminuent et les taux de tubes polliniques éclatés augmentent : 73,1% ± 6,9 germent et 8,9% ± 1,9 éclatent en MGL optimum, contre 36,5% ± 10,9 qui germent et 21,7% ± 8,1 qui éclatent lors d'un traitement avec 20 Unités de PME d'orange par mL de MGL (Figure 63 A).

Chez le mutant *ppme1*, les pourcentages d'éclatement des tubes polliniques restent stables (12%) quelle que soit la concentration de PME ajoutée au milieu (Figure 63 B). En revanche, l'apport de PME permet d'augmenter les taux de germination des grains de pollen (Figure 63 B). En effet, après 6 h de culture en MGL classique, 37,1% ± 2,6 des grains de pollen avaient germé et 13,8% ± 4,9 des tubes polliniques avaient explosé. Avec l'apport de 20 $U.mL^{-1}$ de PME, 51,25% ± 10,5 des grains de pollen *ppme1* ont germé et seulement 15,29% ± 3,9 ont explosé. La différence de germination est extrèmement significative tandis que celle d'éclatement ne l'est pas.

Pour le mutant *pme48-1*, une seule différence significative a été observée pour le taux de germination dans le MGL + 5 $U.mL^{-1}$ de PME d'orange (Figure 63 C). La

germination était de 40,7% ± 2,7 contre 32,1% ± 5,1 dans le MGL classique. Les variations des taux d'éclatement des tubes polliniques n'étaient pas significatives.

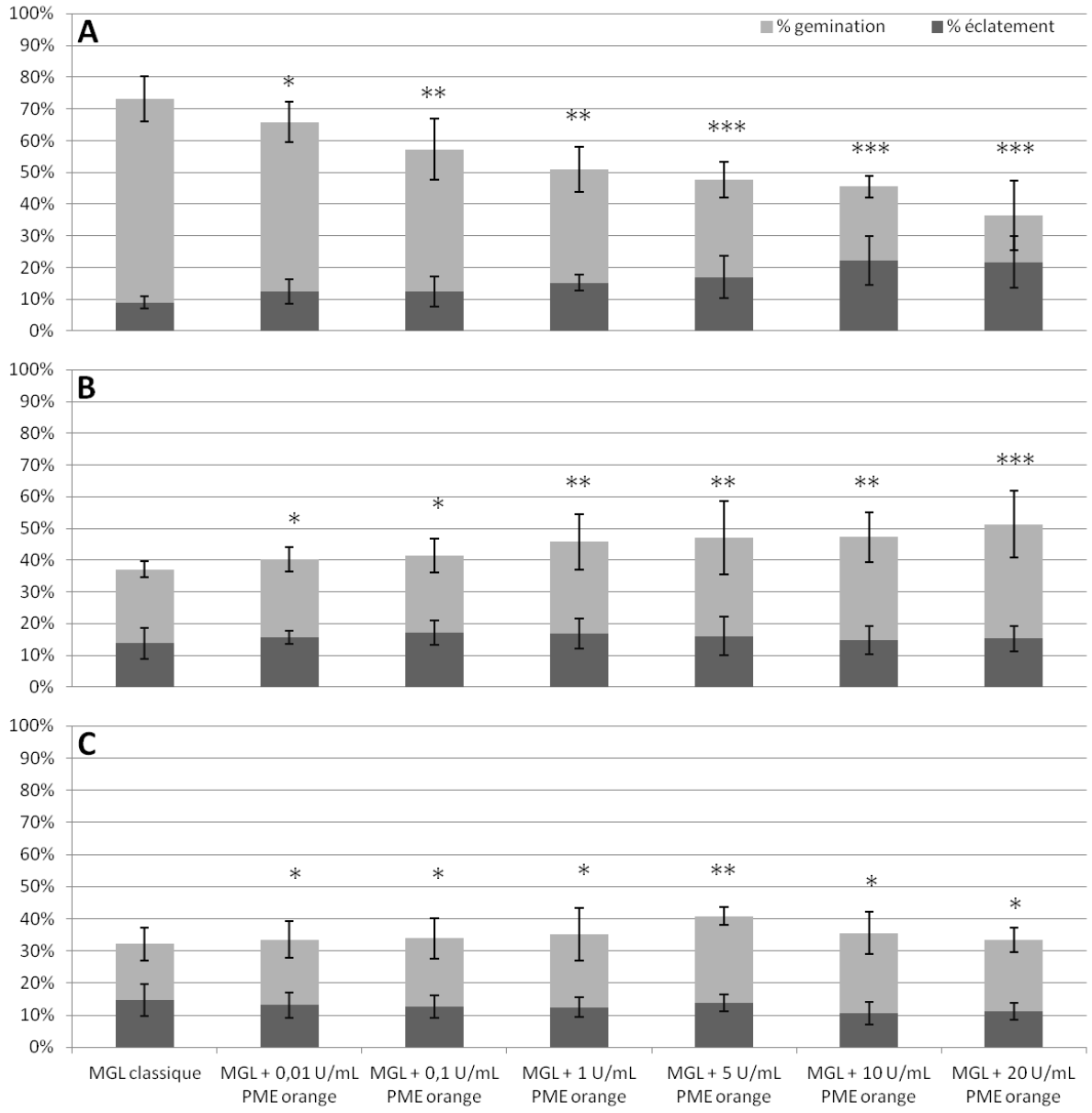


Figure 63 : Taux de germination et d'éclatement des tubes polliniques sauvages (A) ou mutants *ppme1*(B) et *pme48-1* (C), en fonction de la concentration en PME d'orange dans le MGL (de 0,01 à 20 U.mL^{-1} de PME par mL de MGL), après 6 h de culture *in-vitro*.
Les astérisques (***) représentent les résultats obtenus après les analyses statistiques, en comparant toujours par rapport à la condition de culture dans du MGL classique (première colonne).

Lorsque l'on compare les valeurs obtenues chez les mutants avec celles obtenues chez le sauvage, on remarque que pour le mutant *ppme1,* et aux concentrations en PME d'orange dans le MGL de 1 à 10 U.mL^{-1} (Figure 63 B), le taux de germination obtenu pour le sauvage (Figure 63 A), n'est significativement pas différent de celui

obtenu pour le mutant *ppme1* (50,9% contre 45,8% pour 1 U.mL^{-1}, 47,7% contre 47,0% pour 5 U.mL^{-1} et 45,47% contre 47,2% pour 10 U.mL^{-1}).

En ce qui concerne le mutant *pme48-1*, et pour les concentrations en PME d'orange de 0,01 U.mL^{-1} , 0,1 U.mL^{-1} , et 5 U.mL^{-1} (Figure 63 C), ce sont les taux de tubes éclatés qui ne sont significativement pas différents entre le sauvage (Figure 63 A) et le mutant *pme48-1* (avec 12,5% d'éclatement chez le sauvage à 0,01 U.mL^{-1} contre 13,1%, 12,3% d'éclatement chez le sauvage à 0,1 U.mL^{-1} contre 12,7% et 17,0% d'éclatement chez le sauvage à 5 U.mL^{-1} contre 13,8%).

Afin de déterminer si l'ajout de PME exogène pouvait avoir un effet sur le phénotype de double germination observé chez les mutants, le taux de grains de pollen ayant deux tubes polliniques issus d'un même grain de pollen a été déterminé (Figure 64). Les tubes ont été cultivés pendant 6 h en MGL, complémenté ou non, en PME d'orange à différentes concentrations.

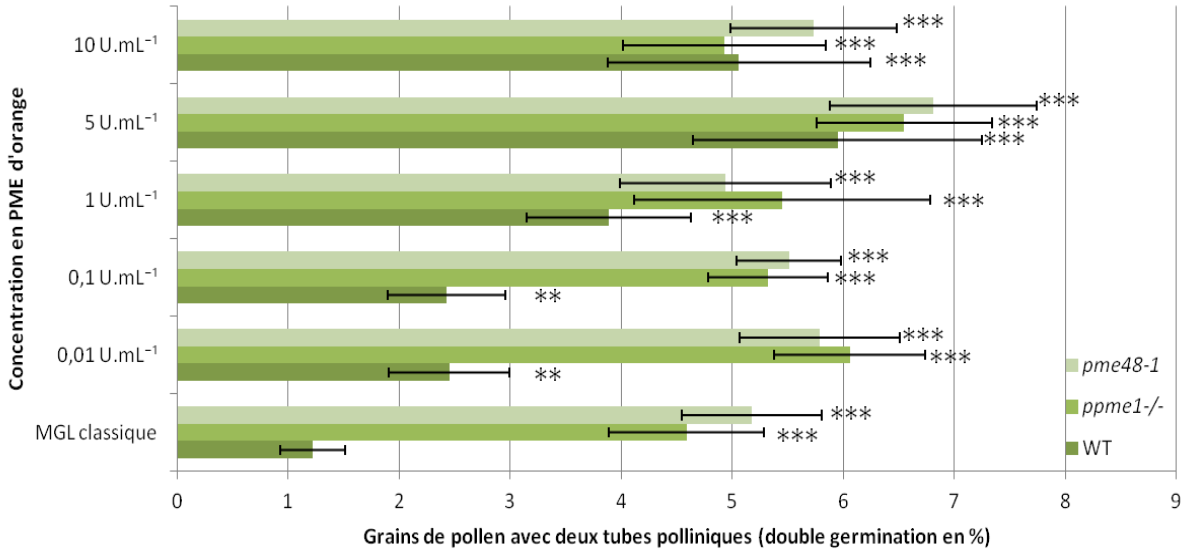


Figure 64 : Comparaison des taux de grains de pollen, sauvages (vert foncé) ou mutants *ppme1* (vert olive) et *pme48-1* (vert clair), ayant deux tubes polliniques émergeant d'un seul grain de pollen (phénotype de double germination).
Les astérisques (***) représentent la significativité des résultats des tests statistiques, en comparant toujours par rapport à la valeur obtenue pour le sauvage en milieu de culture classique.

Il est intéressant de noter que même pour la plus faible concentration en PME d'orange (0,01 U.mL^{-1}), les grains de pollen sauvages (Figure 64, vert foncé) présentent significativement plus souvent le phénotype de double germination qu'en milieu de

germination classique. Ce phénotype de double germination, déjà présenté dans la Figure 52, reste présent chez les deux mutants *ppme1* (Figure 64, vert olive) et *pme48-1* (Figure 64, vert clair), et ce, que ce soit dans du milieu de germination classique, ou complémenté en PME d'orange (Figure 64).

Il est intéressant de noter que l'on observe les mêmes phénotypes (double germination, éclatement des tubes polliniques...) que ce soit lorsque l'on ajoute une PME au milieu de germination du pollen sauvage (PME d'orange), ou lorsque le pollen a une PME absente (mutants *ppme1*, *pme48-1* et *pme48-2*...). Ceci prouve que la relation entre les PMEs et la germination du pollen est bien plus complexe qu'il n'y parait. Cela pourrait s'expliquer par les différents modes d'action des PMEs (processive, aléatoire) mais également par l'action des PMEIs, du pH, de la quantité de calcium libre...

III. 5. b. Utilisation du PMEI de kiwi :

Afin de tester si l'ajout d'un inhibiteur de PME (PMEI) pouvait engendrer les mêmes phénotypes que ceux observés sur les grains de pollen mutants, du PMEI purifié à partir de fruit de kiwi a été ajouté au MGL en présence de pollen sauvage. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans Plant Growth Regulation. Dans cet article, nous avons montré que 4 PME pollen specifiques (PME13, 45, 21 et 28) contiennent les acides aminés nécessaires à l'interaction avec le PMEI de kiwi (Paynel *et al.,* 2014). Par conséquent, des grains de pollen d'*A. thaliana* ont été mis en culture dans un MGL supplémenté par du PMEI purifié de kiwi (Paynel *et al.,* 2014). Dans la condition contrôle, 63,0% ± 3,9 des grains de pollen sauvages avaient germé et étaient restés intacts après 6 h de culture alors que 10,0% ± 7,1 de tubes polliniques avaient éclaté. Quand les grains de pollen étaient placés en culture avec des concentrations croissantes de PMEI purifié, les pourcentages de tubes polliniques ayant éclaté augmentent graduellement et atteignent 85,0% ± 1,7 à 20 µM de PMEI (Figure 65).

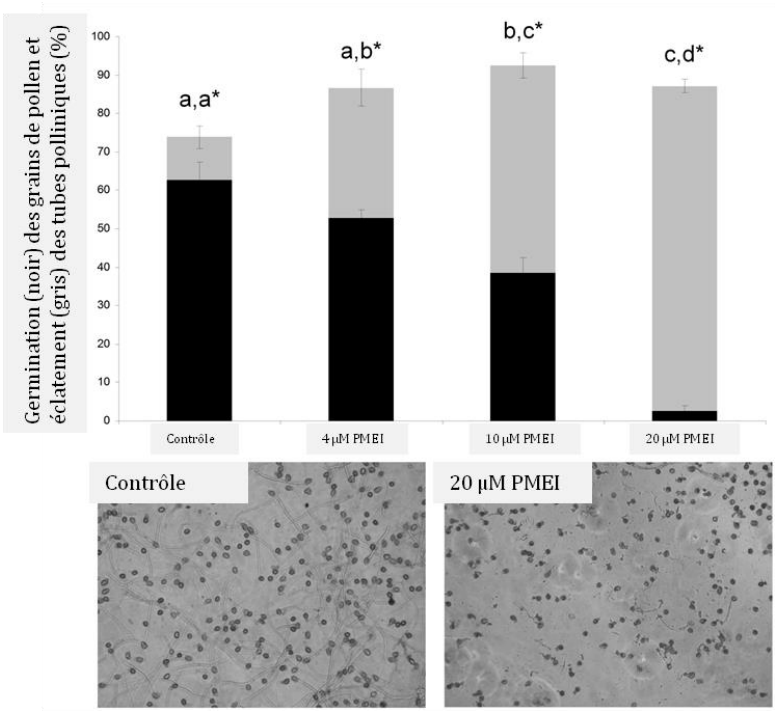


Figure 65 : Effet du PMEI de kiwi sur la germination des grains de pollen et la croissance des tubes polliniques d'*A. thaliana* dans des MGL contenant 0 (contrôle), 4, 10 et 20 µM de PMEI (graphique supérieur).
Les barres noires représentent le pourcentage de germination des tubes polliniques et les barres grises représentent le pourcentage de tubes polliniques germés et éclatés. Les photographies montrent la croissance normale des tubes polliniques (condition contrôle, à gauche) et les grains de pollen avec des tubes polliniques éclatés (condition à 20 µM de PMEI, à droite). (N > 500). Les différentes lettres montrent une différence significative t-test P<0,0001. d'après Paynel *et al.,* (2014).

Ainsi, le PMEI de kiwi ne semble perturber que très légèrement la germination des grains de pollen mais altère la résistance mécanique de la paroi des tubes polliniques en induisant un effet dose-réponse. Il y aurait donc une inhibition soit partielle soit totale de l'activité des PMEs dans la paroi du tube pollinique par le PMEI qui maintiendrait un DM élevé des HGs. Ceci induirait une augmentation de la plasticité pariétale dans la zone apicale/sub-apicale et empêcherait la formation des ponts calciques avec les HGs dé-méthyl-estérifiés réduisant la rigidité de la paroi (Pelletier *et al.,* 2010).

IV : DISCUSSION, CONCLUSION ET PERSPECTIVES :

Les travaux menés dans le cadre de ce doctorat ont porté sur la caractérisation fonctionnelle du rôle de trois PMEs dans le remodelage des polymères pectiques lors de la germination des grains de pollen et la croissance des tubes polliniques. A cet effet, des mutants déficients dans l'expression de trois *PMEs* (deux du groupe 1 *PME48, PPME1* et une du groupe 2, *PME23*) ont été utilisés. La culture *in-vitro* des grains de pollen et des tubes polliniques mutants a révélé plusieurs différences significatives par rapport aux tubes polliniques sauvages. Les tubes polliniques issus des grains de pollen mutants *pme48* et *ppme1* présentent des traits phénotypiques anormaux. Ainsi, de nombreux tubes polliniques explosent et présentent des dichotomies comme observées par Tian *et al.,* (2006). Par contre, le phénotype montrant deux tubes polliniques émergeant d'un même grain de pollen n'avait pas été mentionné par Tian *et al.,* (2006). D'autre part, une réduction importante de la vitesse de germination des tubes polliniques a pu être mise en évidence chez ces mutants. Chez le mutant *pme23*, le retard de germination n'était pas aussi marqué. Les résultats de qRT-PCR montrent que l'impact sur la germination est d'autant plus important que la PME étudiée est fortement exprimée. En effet, les mutants dont la germination est la plus retardée sont *pme48* puis *ppme1* et enfin *pme23*.

Les travaux les plus aboutis ont permis de mettre en évidence que l'absence d'expression de *PME48* ou de *PPME1* aboutissait à une diminution de la vitesse d'imbibition des grains, probablement due à la présence d'une intine dont les HGs sont plus fortement méthylestérifiés que chez le sauvage et donc plus hydrophobes et/ou moins associés au Ca^{2+}. Ce retard d'imbibition ainsi que les phénotypes associés (double germination, dichotomie) ont pu être totalement complémentés par un ajout exogène de Ca^{2+}. Une fois encore, le comportement du mutant *pme23* est différent de *pme48* et *ppme1* puisqu'aucune complémentation avec le Ca^{2+} n'a pu être démontrée. Contrairement aux PME48 et PPME1, la PME23 appartient au PME de groupe II (Sénéchal *et al.,* 2014). L'étude de mutants PMEs du groupe II (*vgd1* et *vgdh*) avait montré à la différence de *pme23* un impact plus drastique avec un effet significatif sur la capacité des tubes polliniques à fertiliser les ovules provoquant une forte réduction du nombre de graines (Jiang *et al.,* 2005). Cependant, comme montré lors de nos analyses

de qRT-PCR, *VGD1* est la *PME* la plus exprimée des 14 PMEs spécifiques du pollen. Ceci pourrait expliquer cette différence entre les deux mutants.

De plus, nos analyses de qRT-PCR n'ont pas établi de relation directe entre l'expression des PMEs du groupe I ou du groupe II lors des différentes phases de la germination du grain de pollen et de la croissance du tube pollinique. Cependant, il est probable que les PMEs du groupe I et du groupe II soient régulées de façon spatio-temporelle afin d'intervenir à des moments précis de la germination ou de la croissance du tube et ce indépendamment de leurs groupes d'appartenance. Par exemple, PME4 et PME5 (VGD1 et VGDH) interviennent dans le maintien de la stabilité du tube en croissance (Jiang *et al.,* 2005) et PME48 intervient principalement dans la germination du grain de pollen bien que la mutation dans *PME48* induise aussi un diamètre du tube pollinique plus important (Leroux *et al.,* 2015).

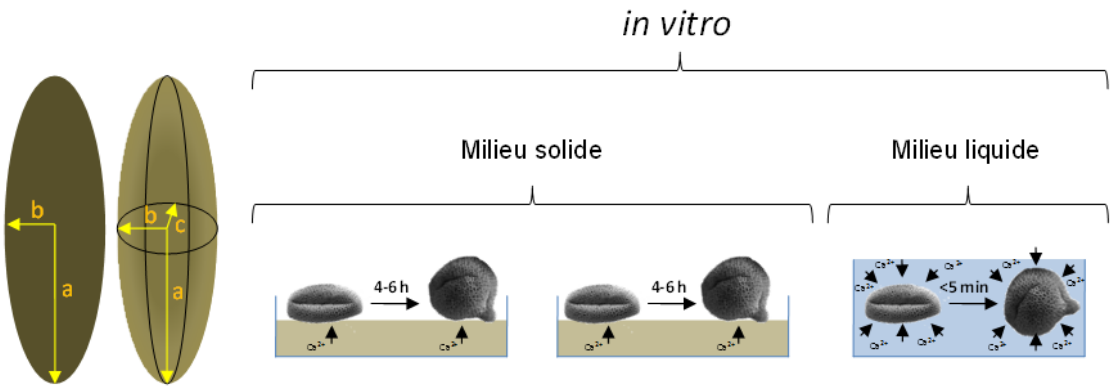
L'ajout exogène de PMEI de kiwi a aussi un effet sur la stabilité des tubes polliniques. Avec des concentrations croissantes, le pourcentage de tubes polliniques qui explosent augmente drastiquement (Paynel *et al.,* 2014). La mutation dans une *PME* ou l'inhibition de l'activité PME par le PMEI ont donc des conséquences similaires. Des résultats identiques ont été obtenus chez le maïs où l'ajout exogène de ZmPMEI1 induit une rupture dans la zone sub-apicale du tube (Woriedh *et al.,* 2013). Quel pourrait-être la cible du PMEI de kiwi dans le tube pollinique ? Un alignement de séquences des PMEs d'Arabidopsis semblerait indiquer que seules les PMEs du groupe 2 possèdent les acides aminés impliqués dans l'interaction entre la PME et le PMEI. PME21 et PME28 pourraient être de bonnes candidates car elles possèdent dans leurs domaines catalytiques les acides aminés identiques et/ou similaires à ceux trouvés dans la PME1 de tomate qui a été cristallisée avec le PMEI de kiwi (Paynel *et al.,* 2014) mais des études expérimentales sont nécessaires pour le vérifier.

Rôle du calcium au cours de la germination et de la croissance des tubes polliniques.

Les interactions entre les ions Ca^{2+} et les parois cellulaires jouent un rôle clé dans la physiologie des plantes (Demarty *et al.,* 1984). Les ions Ca^{2+} sont impliqués dans de nombreux mécanismes comme la stabilisation des structures des parois cellulaires, la croissance acide, les propriétés d'échanges d'ions, ou encore, le contrôle de l'activité des

enzymes de remodelage de la paroi. Toutes ces propriétés proviendraient de la liaison des ions Ca^{2+} avec les HGs présents dans les parois cellulaires (Demarty *et al.,* 1984).

Lorsque les HGs sont dé-méthylestérifiés de manière processive, les charges négatives établies par les groupements carboxyls (COO^{-}) peuvent interagir avec des ions Ca^{2+}, permettant ainsi l'association de plusieurs chaines d'HGs. Cette association nommée « boîtes-à-œufs » (Jarvis *et al.,* 2003 ; Micheli, 2001 ; Pelloux *et al.,* 2007), pourrait être une des sources de Ca^{2+}nécessaire à la croissance des tubes polliniques. Le Ca^{2+}, comme d'autres ions, est impliqué dans la croissance et la germination des tubes polliniques (Brewbaker et Kwack, 1963 ; Dumas et Gaude, 2006). En effet, la germination des grains de pollen et la croissance des tubes polliniques en condition *in-vitro* nécessitent la présence de Ca^{2+}dans le milieu de culture chez la majorité des espèces. Comme il a été précisé précédemment, dans le cas de PME48 et de PPME1, il existerait un lien étroit entre le degré de méthylestérification des HGs et la quantité de Ca^{2+} stockée dans l'intine. Ces résultats peuvent suggérer que le Ca^{2+}, directement ou par l'intermédiaire de messager(s) secondaire(s), serait capable d'activer l'expression d'autres systèmes enzymatiques ou non enzymatiques afin de dégrader l'intine et ainsi favoriser la germination du grain de pollen. Le Ca^{2+} a en effet déjà été associé à de nombreux mécanismes cellulaires dont la germination du grain de pollen et la croissance du tube pollinique. Plusieurs études ont montré une accumulation localisée du Ca^{2+} dans le grain de pollen avant sa germination principalement dans la zone d'émergence du futur tube pollinique et une partie de celui-ci pourrait provenir des « boîtes-à-œufs » (Iwano *et al.,* 2004 ; Konrad *et al.,* 2011 ; Steinhorst et Kudla, 2013). La différence de germination observée *in-vitro* entre le milieu liquide (retard de germination) et le milieu solide (quasi absence de germination) chez *pme48* pourrait s'expliquer par la disponibilité du Ca^{2+}. En effet, en milieu liquide, les grains de pollen sont entièrement submergés dans le milieu de culture et la disponibilité en Ca^{2+} est estimée à 5,3 nmoles par grain et est donc supérieure à celle calculée en milieu solide (1,7 nmoles par grain) où la surface d'échange entre le grain de pollen et le milieu est réduite (Figure 66). L'augmentation de la concentration en Ca^{2+} dans le milieu solide de 5 à 7,5 mM permet d'augmenter localement la disponibilité en Ca^{2+} à l'interface grain de pollen-gélose et le grain de pollen bénéficie d'une quantité estimée de Ca^{2+} équivalente à 2,6 nmoles par grain. Cette légère augmentation de Ca^{2+} permet ainsi de restaurer la germination des grains de pollen chez les grains de pollen mutants *pme48* et *ppme1*.



[Ca^{2+}] dans le milieu	5 mM	7.5 mM	5 mM
Surface du grain en contact avec le milieu	353 µm^2	353 µm^2	990 µm^2
Disponibilité en Ca^{2+}	1,7 nmoles/grain	2,6 nmoles/grain	5,3 nmoles/grain

Figure 66 : Estimation de la disponibilité en Ca^{2+} au cours de l'imbibition et de la germination du pollen d'*Arabidospis* cultivé *in-vitro* sur milieu solide ou en milieu liquide.
La surface de contact entre le pollen et son substrat en milieu solide a été déterminée en calculant la surface d'une ellipse dont le demi grand axe (a) mesure 15 µm et le demi petit axe (b) 7,5 µm selon la formule suivante $surface_{ellipse} = \pi*a*b$. Dans le cas de la culture en milieu liquide, la surface en contact est un ellipsoïde dont le demi grand axe (a) mesure 15 µm, le demi moyen axe (b) 7,5 µm et le demi petit axe (c) 5 µm. La surface de cet ellipsoïde a été déterminée à l'aide du calculateur de surface développé par Casio et disponible à l'adresse web suivante : http://keisan.casio.com/exec/system/1223392149. Le nombre de mole disponible par grain a été estimé en calculant le volume autour de la surface de contact en prenant arbitrairement une épaisseur de 1 µm. La durée indiquée est le temps nécessaire pour la germination du pollen sauvage à 5 mM et *pme48* à 7,5 mM en milieu solide.

Dans un contexte *in-vivo*, une étude en 2004 de Zhao et collaborateurs a montré qu'un faible taux de Ca^{2+} était détecté dans la matrice extracellulaire (ECM) du tissu de transmission dans les styles non pollinisés chez le lys (Zhao *et al.,* 2004). Après pollinisation, le pool de Ca^{2+} augmente dans l'ECM. Ce Ca^{2+} est aussi détecté dans le cytoplasme et les vésicules proches de l'apex du tube pollinique (Zhao *et al.,* 2004). Des observations similaires avaient été faites chez le pétunia (Bednarska et Butowt, 1995). De même, Iwano *et al.,* (2004) ont montré trois pulses de Ca^{2+} dans les papilles stigmatiques d'*A. thaliana*. Le premier pulse était observé dès le contact du grain de pollen sur la papille stigmatique, le second lors de l'imbibition du grain de pollen et un troisième lors de la pénétration du tube pollinique dans la paroi de la papille. Ainsi, il est fort probable qu'une partie du Ca^{2+} nécessaire à la germination du grain de pollen

provienne des papilles stigmatiques. Ceci pourrait alors expliquer que le phénotype observé *in-vivo* chez *pme48* soit juste caractérisé par un léger retard de germination par rapport au sauvage.

D'autre part, si une partie du Ca^{2+} nécessaire à la germination provient de ces « boîtes-à-œufs », cela nécessiterait sans doute la dégradation des HGs. Celle-ci pourrait provenir de l'action de pectate lyases (PLLs) qui peuvent dégrader les chaines d'HGs faiblement méthylestérifiés liées entre elles (Marín-Rodríguez *et al.,* 2002) et/ou de PGases. Des études de transcriptomique ont montré que quatre *PLLs* putatives (*PLL3, 6, 7* et *18*) étaient fortement exprimées dans le pollen d'*A. thaliana* (Mollet *et al.,* 2013). *PLL7* est la plus exprimée dans le grain de pollen sec, imbibé et dans les tubes polliniques cultivés *in-vitro* et en semi *in-vivo.* De même, six putatives *PGases* sont aussi fortement exprimées dans le grain de pollen et dans le tube pollinique cultivés *in-vitro* et en semi *in-vivo* (Mollet *et al.,* 2013).

Le rôle de l'interaction entre le Ca^{2+} et les HGs dans les propriétés mécaniques de la paroi des tubes polliniques a été estimé par CFM (Cellular Force Microscope ; Vogler *et al.,* 2013). Les résultats obtenus en collaboration avec le Pr C. Ringli de l'Université de Zurich en Suisse sont présentés dans la Figure 67. Ils révèlent que les tubes polliniques *pme48* présentent une rigidité apparente inférieure à celle des tubes polliniques sauvages cultivés en milieu liquide. Ces résultats semblent corroborer l'hypothèse selon laquelle les HGs du mutant *pme48* étant plus méthylestérifiés (Leroux *et al.,* 2015), le Ca^{2+} est sans doute moins abondant. Ceci va donc dans le sens du rôle du Ca^{2+} et des HGs faiblement méthylestérifiés dans la rigidification de la paroi (Bosch *et al.,* 2005). Ceci peut aussi expliquer pourquoi le diamètre des tubes polliniques mutants est plus large que celui mesuré chez le sauvage. En effet, comme la paroi des tubes polliniques des mutants est plus élastique, sous la pression de turgescence, le diamètre du tube pollinique augmente jusqu'à un certain point où le tube pollinique va exploser. Ces résultats sont aussi en accord avec ceux obtenus lorsque des tubes polliniques étaient traités avec une PME commerciale. En effet l'ajout exogène et modéré de PME rendait les tubes polliniques plus rigides que les tubes polliniques non traités (Parre et Geitmann, 2005).

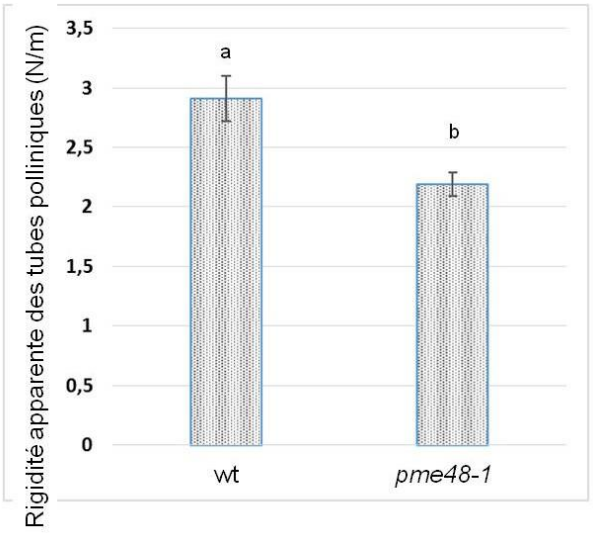


Figure 67 : Mesure de la rigidité apparente des tubes polliniques sauvages et *pme48* cultivés en milieu liquide par « cellular force microscopy ».
n= 25 (sauvage) et 28 (*pme48*) mesures. Collaboration T. Ndinyanka Fabrice et C. Ringli, Université de Zurich, Suisse (résultats non publiés).

Des analyses protéomique et cytologique ont révélé le rôle important du complexe Ca^{2+}/calmoduline (CALcium MODULated ProteIN, CaM) lors de la croissance du tube pollinique (Chen *et al.,* 2009). CaM est une protéine ubiquitaire capable, comme son nom l'indique, d'interagir avec le Ca^{2+}et intervient comme messager intermédiaire dans la transduction du signal calcique (Snedden et Fromm, 1998). Plusieurs canaux impliqués dans les influx et efflux calciques ont été étudiés. Le premier est le canal CNGC18 (Cyclic Nucleotide-Regulated Ion Channel18) (Figure 68 A) (Frietsch *et al.,* 2007). Les CNGC sont des canaux cationiques ayant la capacité de créer des courants de Ca^{2+} (Figure 68 A) (Kudla *et al.,* 2010 ; Ma et Berkowitz, 2011). Les compartiments comme la vacuole et le réticulum endoplasmique (RE) sont supposés contrôler le gradient de Ca^{2+} par la séquestration du Ca^{2+} (Yoon *et al.,* 2006). Les pompes calciques qui pourraient expliquer la mise en place et la régulation du gradient de Ca^{2+} dans les tubes polliniques en croissance sont des ATPases calciques de type-II localisées dans le RE : ACA2 (Autoinhibited Ca^{2+} ATPase2) et ECA1 (ER-type Ca^{2+} ATPase1) (Figure 68 A) (Harper *et al.,* 1998 ; Hwang *et al.,* 2000). La protéine ACA2, exprimée dans les grains de pollen, est une ATPase de type-IIB auto-inhibée par le Ca^{2+} (Sze *et al.,* 2006) alors que ECA1, est une ATPase calcique de type-IIA. Un traitement avec l'acide cyclopiazonique (CPA), un inhibiteur spécifique d'ATPases calciques de type-IIA, inhibe la croissance du tube pollinique et induit une diminution de la concentration en Ca^{2+} dans le RE (Figure 68 A) (Geisler *et al.,* 2000 ; Iwano *et al.,* 2009). Ainsi, l'absorption de Ca^{2+} dans le RE

pourrait permettre les oscillations de Ca^{2+} dans les tubes polliniques (Iwano *et al.,* 2009). Parmi les 14 ACA (Autoinhibited Ca^{2+}ATPases), ACA9 a été plus particulièrement étudiée (Heppler *et al.,* 2012).

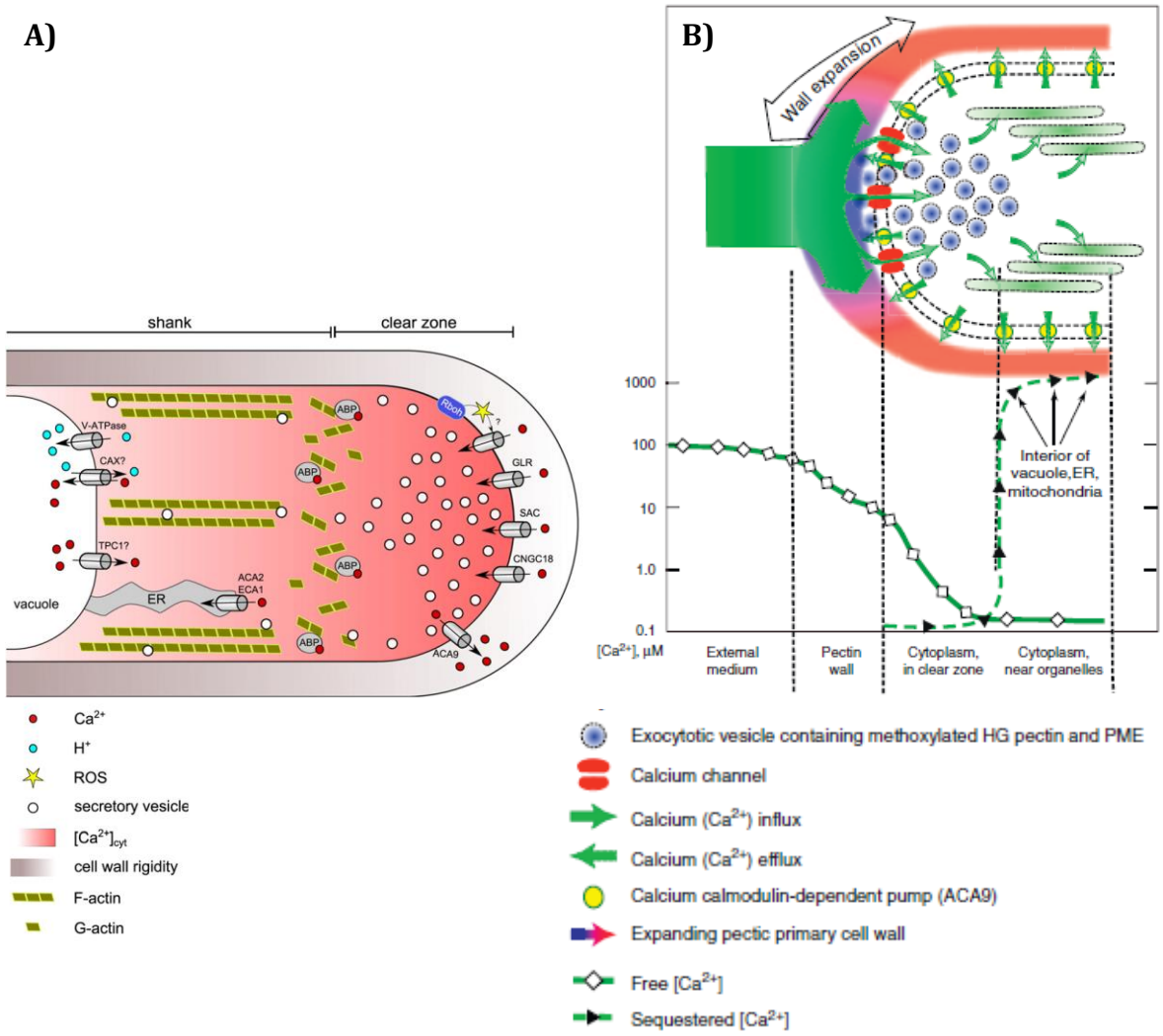


Figure 68 : Représentation de l'implication des ions calciques à l'apex du tube pollinique, A) dans la zone claire (clear zone, d'après Steinhorst et Kudla, 2013) et B) durant l'expansion de la paroi (d'après Heppler *et al.,* 2012).

Les abréviations sont données dans le texte.

ACA9 est répartie uniformément dans la membrane plasmique des tubes polliniques en croissance (Figure 68 B) et son activité serait de séquestrer le Ca^{2+} cytosolique dans l'apoplaste. Une étude portant sur des mutants d'insertion d'ADN-T dans ce gène a révélé une stérilité mâle partielle (Schiøtt *et al.,* 2004). Tout comme ACA2, l'ACA9 est auto-inhibée par le Ca^{2+} *via* une activation du complexe Ca^{2+} / CaM, ce

qui suggère que la majorité des ACA9 actives sont présentes dans la région apicale du tube pollinique en raison du gradient de Ca^{2+} (Figure 68 B).

Les canaux responsables de la plupart des influx du Ca^{2+} dans le cytosol du tube pollinique résident dans la membrane plasmique. Ainsi la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ est la plus élevée dans la région apicale à proximité de la membrane plasmique (Figure 68 A et B). En revanche, on en sait peu sur la contribution des stocks de Ca^{2+} internes pour l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$. TPC1 (Two-Pore Channel1), un canal vacuolaire voltage-dépendant du Ca^{2+}, a été mis en avant par Konrad et collaborateurs, comme un candidat potentiel (Figure 68 A), mais à ce jour aucune preuve de son expression ou de son rôle n'a été démontrée dans le pollen (Konrad *et al.,* 2011). Plus récemment, une étude portant sur CML25 (Calmoduline-Like protein 25) a montré que celle-ci était impliquée dans la régulation du Ca^{2+}cytosolique par l'influx de potassium, dans les grains de pollen et les tubes polliniques d'*A. thaliana* (Wang *et al.,* 2015).

Récemment, un lien a été établi entre calmoduline, Ca^{2+} et le remodelage des pectines. En effet, le gène *AtNPG1* (*NO POLLEN GERMINATION1*) code pour une protéine contenant un domaine CaMB (calmodulin Binding Domain). Comme son nom l'indique, la mutation dans ce gène empêche la germination des grains de pollen chez *A. thaliana* bien que ceux-ci soient viables et morphologiquement normaux (Golovkin et Reddy, 2003). Cette protéine est localisée dans le cytoplasme et dans la paroi du grain de pollen et du tube pollinique et pourrait donc servir de messager entre le Ca^{2+} pariétal et la signalisation calcique intracellulaire (Shin *et al.,* 2014). Au cours de cette étude, les auteurs ont aussi montré que AtNPG1 pouvait interagir *in-vitro* et *in-vivo* avec les quatre PLLs putatives fortement exprimées dans le pollen suggérant que NPG1 *via* le Ca^{2+}, une CaM et les PLLs, pourrait réguler la dégradation des HGs et ainsi l'émergence du tube pollinique.

Implication des ROS dans la germination, la croissance et la plasticité du tube pollinique.

De récents travaux ont aussi montré que le Ca^{2+} extracellulaire pouvait activer, lors de son entrée dans la cellule, une voie de signalisation générée par les ROS (Reactive Oxygen Species) *via* les RbOHs (Respiratory burst Oxidase Homologs) notamment par RbohH et RbohJ chez *Arabidopsis*. RbohH et RbohJ sont indispensables à une croissance normale du tube pollinique (Kaya *et al.,* 2014). Depuis peu, les chercheurs s'intéressent

aussi à la régulation de la plasticité pariétale par des systèmes non enzymatiques, en particulier les formes actives de l'oxygène (ROS). Parmi ces ROS, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical hydroxyl (·OH) et l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) participent à la régulation des propriétés mécaniques des parois (Carol et Dolan, 2006 ; Liszkay *et al.,* 2004 ; Lindsay et Fry, 2008). Il a été mis en évidence qu'en condition de stress biotiques et abiotiques, les ROS produites en quantité importante associées au Ca^{2+} pourraient (1) modifier directement les propriétés mécaniques de la paroi et (2) induire l'expression de gènes codant pour des protéines de remodelage des composés pariétaux (Dangl et Jones, 2001 ; Tenhaken, 2015). En effet, il a été montré que ·OH pouvait cliver localement des polysaccharides de la paroi (Fry *et al.,* 2001 ; Schopfer, 2001). Inversement, le H_2O_2 en présence de peroxydase peut participer au renforcement de la paroi en favorisant des liaisons entre les tyrosines des protéines pariétales ou entre des groupements phénoliques (Wolf et Höfte, 2014). D'autre part, il a été montré que certaines peroxydases pouvaient se fixer aux HGs associés au Ca^{2+} (Carpin *et al.,* 2001) participant probablement à la régulation des ROS dans l'apoplaste. Il existe donc un système de régulation de la plasticité pariétale associant le Ca^{2+}, les enzymes de remodelage de la paroi et les ROS. Plusieurs travaux ont montré que les ROS et le Ca^{2+} avaient un rôle prépondérant lors de la germination du grain de pollen (Speranza *et al.,* 2012), la croissance du tube pollinique (Potocký *et al.,* 2007 ; Boisson-Dernier *et al.,* 2013) et au cours du stade final de la reproduction lorsque les tubes polliniques explosent dans les synergides permettant la libération des gamètes (Duan *et al.,* 2014).

D'autres radicaux libres de l'azote (RNS) comme le NO sont aussi produits par les grains de pollen et pourraient aussi jouer un rôle important dans la signalisation cellulaire (Bright *et al.,* 2009) mais leurs fonctions exactes ne sont pas connues. Il avait était suggéré que le NO pourrait servir à la répulsion des tubes polliniques (Prado *et al.,* 2004), affecterait le ciblage des ovules par le tube pollinique et modulerait la signalisation dépendante du Ca^{2+} (Prado *et al.,* 2008).

L'action des PMEs sur les HGs méthylestérifiés s'accompagne de la libération de protons et de méthanol. Le devenir et le rôle de ce dernier est peu connu. Cependant il pourrait potentiellement engendrer la production de ROS mais aussi, récemment, il a été proposé qu'il pourrait servir de molécule signal (Komarova *et al.,* 2014).

Pour conclure, les travaux conduits pendant mon doctorat sur les mutants *pme48* et *ppme1* ont clairement lié la germination du grain de pollen, le remodelage de la paroi et le Ca^{2+}. Des analyses complémentaires sont nécessaires pour le mutant *pme23* pour vérifier si le DM des HGs est affecté. A ce jour, la relation précise entre les ROS, le calcium et le remodelage de la paroi du grain de pollen en germination et la croissance du tube pollinique reste très mal définie. Cette étude offre donc de nombreuses perspectives de recherche afin de préciser les mécanismes fins de régulation du remodelage de la paroi et les voies de signalisations impliquées dans la germination et la croissance des tubes polliniques. Existe-t-il uniquement des paires spécifiques entre PMEs et PMEIs dans le pollen comme montré entre PPME1 et PMEI2 (Rockel *et al.,* 2008) ? Existe-t-il comme pour les PMEs, des inhibiteurs de PGases dans le pollen ? Une PME du groupe II donnée est-elle spécifiquement clivée par une subtilase dans le pollen comme il l'a été montré dans la racine d'*A. thaliana* entre PME17 et SBT3.5 (Sénéchal *et al.,* 2014) ? Les HGs fortements méthylestérifiés, les PMEs et les PMEIs co-existent-ils dans les vésicules Golgiennes lors de leurs secrétions ? Existe-t-il un lien direct entre concentration en Ca^{2+} et ROS? Si oui, quelles ROS ? L'expression des PMEs et d'autres enzymes de remodelage de la paroi au cours de la germination est-elle contrôlée par des oscillations de Ca^{2+}, par des ROS ou par les deux ? Le méthanol produit lors de la réaction de déméthylestérification des HGs par les PMEs est-il lui-même un messager ? De même, les HGs peuvent aussi être acétylestérifiés et sous l'action de pectine acétylesterases (PAEs), des acétates sont libérés. Quels pourraient être leurs devenirs ? Finalement, la paroi des tubes polliniques, outre les HGs, est aussi très riche en arabinanes (Dardelle *et al.,* 2010), quel rôle pourraient-ils jouer dans la progression du tube pollinique dans un contexte *in-vivo* ?

V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A.

Abercrombie JM, O'Meara BC, Moffatt AR, Williams JH. Developmental evolution of flowering plant pollen tube cell walls : *Callose synthase* (*CalS*) gene expression patterns. *EvoDevo.* **2011. 2 :** 14-27.

Abramoff MD, Magelhaes PJ, Ram SJ. Image processing with ImageJ. *Biophoton Int.* **2004. 11 :** 36-42.

Abreu I, Oliveira M. Immunolocalisation of arabinogalactan proteins and pectins in *Actinidia deliciosa* pollen. *Protoplasma.* **2004. 224 :** 123-128.

Acosta-Garcia G, Vielle-Calzada JP. A classical arabinogalactan protein is essential for the initiation of female gametogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **2004. 16 :** 2614-2628.

Adair SW, Appel H. Identification of a highly conserved hydroxyproline-rich glycoprotein in the cell walls of *Chlamydomonas reinhardtii* and two other Volvocales. *Planta*. **1989. 179 :** 381-386.

AGI Arabidopsis Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature.* **2000. 408 :** 796-815.

Ahn YO, Zheng M, Bevan DR, Esen A, Shiu SH, Benson J, Peng HP, Miller JT, Cheng CL, Poulton JE, Shih MC. Functional genomic analysis of *Arabidopsis thaliana* glycoside hydrolase family 35. *Phytochemistry.* **2007. 68 :** 1510-1520.

Akiyama Y, Mori M, Kato K. 13C-NMR analysis of hydroxyrpoline arabinosides from Nicotiana tabacum. *Agric Biol Chem.* **1980. 44 :** 2487-2489.

Allen AM, Lexer C, Hiscock SJ. Comparative analysis of pistil transcriptomes reveals conserved and novel genes expressed in dry, wet, and semidry stigmas. *Plant Physiol.* **2010. 154 :** 1347-1360.

Andème-Onzighi C, Sivaguru M, Judy-March J, Baskin TI, Driouich A. The *reb1-1* mutation of *Arabidopsis* alters the morphology of trichoblasts, the expression of arabinogalactan-proteins and the organization of cortical microtubules. *Planta*. **2002. 215 :** 949-958.

Anderson JR, Barnes WS, Bedinger P. 2, 6-dichlorobenzonitrile, a cellulose biosynthesis inhibitor, affects morphology and structure integrity of petunia and lily pollen tubes. *J Plant Physiol.* **2002. 159 :** 61-67.

Antão CM, Malcata FX. Plant serine proteases: biochemical, physiological and molecular features. *Plant Physiol Biochem.* **2005. 43 :** 637-650.

Aouar L, Chebli Y, Geitmann A. Morphogenesis of complex plant cell shapes : The mechanical role of crystalline cellulose in growing pollen tubes. *Sex Plant Reprod*. **2010. 23 :** 15-27.

Ariizumi T, Hatakeyama K, Hinata K, Sato S, Kato T, Tabata S, Toriyama K. The HKM gene, which is identical to the MS1 gene of *Arabidopsis thaliana*, is essential for primexine formation and exine pattern formation. *Sex Plant Reprod*. **2005. 18 :** 1-7.

Arvidsson S, Kwasniewski M, Riaño-Pachón DM, Mueller-Roeber B. QuantPrime - a flexible tool for reliable high-throughput primer design for quantitative PCR. *BMC Bioinformatics*. **2008. 9 :** 465-480.

Atmodjo MA, Hao Z, Mohnen D. Evolving Views of pectin biosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* **2013. 64 :** 747-779.

B.

Bacic A. Breaking an impasse in pectin biosynthesis. *PNAS*. **2006. 103 :** 5639-5640.

Baillon H. Histoire des plantes : Renonculacées, dilléniacées, magnoliacées, anonacées. *Librairire de L. Hachette et Cie.* **1869.**

Balestrieri C, Castaldo D, Giovane A, Quagliuolo L, Servillo L. A glycoprotein inhibitor of pectin methylesterase in kiwi fruit (*Actinidia chinensis*). *Eur J Biochem.* **1990. 193 :** 183-187.

Baskin TI, Busby CH, Fowke LC, Saturant M, Gubler F. Improvements in immunostaining samples embedded in methacrylate: localization of microtubules and other antigens throughout developing organs in plants of diverse taxa. *Planta*. **1992. 187 :** 405-413.

Baumberger N, Ringli C, Keller B. The chimeric leucine-rich repeat/extension cell wall protein LRX1 is required for root hair morphogenesis in *Arabidopsis thaliana. Genes Dev.* **2001. 15 :** 1128-1139.

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

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

Bednarska E, Butowt R. Calcium in pollen-pistil interaction in Petunia hybrida Hort. III. Localization of Ca^{2+} ions and $Ca(^{2+})$-ATPase in pollinated pistil. *Folia Histochem Cytobiol*. **1995. 33 :** 125-132.

Beers EP, Jones AM, Dickerman AW. The S8 serine, C1A cysteine and A1 aspartic protease families in *Arabidopsis*. *Phytochemistry.* **2004. 65 :** 43-58.

Bernal AJ, Yoo CM, Mutwil M, Jensen JK, Hou G, Blaukopf C, Sørensen I, Blancaflor EB, Scheller HV, Willats WG. Functional analysis of the *cellulose synthase-like* genes *CSLD1*, *CSLD2*, and *CSLD4* in tip-growing *Arabidopsis* cells. *Plant Physiol.* **2008. 148 :** 1238-1253.

Bertheau Y, Madgidi-Hervan E, Kotoujansky A, Nguyen-The C, Andro T, Coleno A. Detection of depolymerase isoenzymes after electrophoresis or electrofocusing, or in titration curves. *Anal Biochem*. **1984. 139 :** 383-389.

Bessueille L, Bulone V. A survey of cellulose biosynthesis in higher plants. *Plant Biotech J*. **2008. 25 :** 315-322.

Bewley JD, Hempel FD, McCormick S, Zambryski P. Reproductive development. Dans B. Buchanan, W. Guissem, R. Jones, ed, *Biochemistry and molecular biology of plants*. *Am Soc Plant Physiol*, Rockville. **2000.** 988-1043.

Boavida LC, Vieira AM, Becker JD, Feijò JA. Gametophyte interaction and sexual reproduction : How plants make a zygote. *Int J Dev Biol*. **2005. 49 :** 615-632.

Boavida LC, McCormick S. Temperature as a determinant factor for increased and reproducible in-vitro pollen germination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **2007. 52 :** 570-582.

Boisson-Dernier A, Roy S, Kritsas K, Grobei MA, Jaciubek M, Schroeder J, Grossniklaus U. Disruption of the pollen-expressed *FERONIA* homologs *ANXUR1* and *ANXUR2* triggers pollen tube discharge. *Development.* **2009. 136 :** 3279-3288.

Boisson-Dernier A, Lituiev DS, Nestorova A, Franck, CM, Thirugnanarajah S, Grossniklaus U. ANXUR receptor-like kinases coordinate cell wall integrity with growth at the pollen tube tip via NADPH oxidases. *PLoS Biol*. **2013. 11 :** e1001719.

Borges F, Gomes G, Gardner R, Moreno N, McCormick S, Feijó JA, Becker JD. Comparative transcriptomics of *Arabidopsis* sperm cells. *Plant Physiol*. **2008. 148 :** 1168-1181.

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

Bosch M, Hepler PK. Pectin Methylesterases and Pectin Dynamics in Pollen Tubes. *Plant Cell.* **2005. 17 :** 3219-3226.

Bots M, Feron R, Uehlein N, Weterings K, Kaldenhoff R, Mariani T. PIP1 and PIP2 aquaporins are differentially expressed during tobacco anther and stigma development. *J Exp Bot*. **2005a. 56 :** 113-134.

Bots M, Vergeldt F, Wolters-Arts M, Weterings K, van As H, Mariani C. Aquaporins of the PIP2 class are required for efficient anther dehiscence in tobacco. *Plant Physiol.* **2005b. 137:** 1049-1056.

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

Bove J, Vaillancourt B, Kroeger J, Hepler PK, Wiseman PW, Geitmann A. Magnitude and direction of vesicle dynamics in growing pollen tubes using spatiotemporal image correlation spectroscopy and fluorescence recovery after photobleaching. *Plant Physiol.* **2008. 147 :** 1646-1658.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. **1976. 72 :** 248-254.

Brady JD, Sadler IH, Fry SC. Pulcherosine, an oxidatively coupled trimer of tyrosine in plant cell walls: its role in cross-link formation. *Phytochem*. **1998. 47 :** 349-353.

Braybrook SA, Peaucelle A. Mechano-chemical aspects of organ formation in *Arabidopsis thaliana*: the relationship between auxin and pectin. *PloS ONE*. **2013. 8 :** e57813.

Brett CT. Cellulose microfibrils in plants : biosynthesis, deposition, and integration into the cell wall. *Int Rev Cytol.* **2000. 199 :** 161-199.

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

Bright J, Hiscock SJ, James PE, Hancock JT. Pollen generates nitric oxide and nitrite: a possible link to pollen-induced allergic responses. *Plant Physiol and Biochem*. **2009. 47 :** 49-55.

Brown DM, Zhang Z Stephens E Dupree P Turner SR. Characterization of IRX10 and IRX10-like reveals an essential role in glucuronoxylan biosynthesis in *Arabidopsis. Plant J.* **2009. 57 :** 732-746.

Brown Jr RM. Cellulose structure and biosynthesis what's in store for the 21st century? *J Polymer Sci A Polymer Chem.* **2004. 42 :** 487-495.

Brownfield L, Ford K, Doblin MS, Newbigin E, Read S, Bacic A. Proteomic and biochemical evidence links the callose synthase in *Nicotiana alata* pollen tubes to the product of the NaGSL1 gene. *Plant J.* **2007. 52 :** 147-156.

Brownfield L, Wilson S, Newbigin E, Bacic A, Read S. Molecular control of the glucan synthase-like protein NaGSL1 and callose synthesis during growth of *Nicotiana alata* pollen tubes. *Biochem J*. **2008. 414 :** 43-52.

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

Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL. Biochemistry and molecular biology of plants. *Am Soc Plant Physiol*, Rockville. **2000.** 1158-1202.

Busot GY, McClure B, Ibarra-Sánchez CP, Jiménez-Durán K, Vázquez-Santana S, Cruz-García F. Pollination in *Nicotiana alata* stimulates synthesis and transfer to the stigmatic surface of *Na*StEP, a vacuolar Kunitz proteinase inhibitor homologue. *J Exp Bot.* **2008. 59 :** 3187-3201.

C.

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

Cai G, Cresti M. Organelle motility in the pollen tube : a tale of 20 years. *J Exp Bot.* **2009. 60 :** 495-508.

Cai G, Faleri C, Del Casino C, Emons AMC, Cresti M. 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.* **2011. 155 :** 1169-1190.

Cai G, Parrotta L, Cresti M. Organelle trafficking, the cytoskeleton, and pollen tube growth. *J Integr Plant Biol.* **2015. 57 :** 63-78.

Cameron RG, Luzio GA, Goodner K, Williams MAK. Demethylation of a model homogalacturonan with a salt-independent pectin methylesterase from citrus : I. Effect of pH on demethylated block size, block number and enzyme mode of action. *Carbohyd Polym*. **2008. 71 :** 287-299.

Campanoni P, Blatt MR. Membrane trafficking and polar growth in root hairs and pollen tubes. *J Exp Bot.* **2007. 58 :** 65-74.

Cannon MC, Terneus K, Hall Q, Tan L, Wang Y, Wegenhart BL, Chen L, Lamport DTA, Chen Y, Kieliszewski MJ. Self-assembly of the plant cell wall requires an extensin scaffold. *PNAS.* **2008. 105 :** 2226-2231.

Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy) : an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res*. **2009. 37 :** 233-238.

Carol RJ, Dolan L. The role of reactive oxygen species in cell growth: lessons from root hairs. *J Exp Bot*. **2006. 57 :** 1829-1834.

Carpin S, Crevecoeur M, de Meyer M, Simon P, Greppin H, Penel C. Identification of a Ca^{2+}-pectate binding site on an apoplastic peroxidase. *Plant Cell*. **2001. 13 :** 511-520.

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

Chebli Y, Kaneda M, Zerzour R, Geitmann A. The cell wall of the *Arabidopsis thaliana* pollen tube spatial distribution, recycling and network formation of polysaccharides. *Plant Physiol.* **2012. 160 :** 1940-1955.

Chen CG, Pu ZY, Moritz RL, Simpson RJ, Bacic A, Clarke AE, Mau SL. Molecular cloning of a gene encoding an arabinogalactan-protein from pear (*Pyrus communis*) cell suspension culture. *PNAS*. **1994. 91 :** 10305-10309.

Chen KM, Wu GL, Wang YH, Tian CT, Samaj J, Baluska F, Lin JX. The block of intracellular calcium release affects the pollen tube development of *Picea wilsonii* by changing the deposition of cell wall components. *Protoplasma.* **2008. 233 :** 39-49.

Chen T, Wu X, Chen Y, Li X, Huang M, Zheng M, Baluska F, Samaj J, Lin J. Combined proteomic and cytological analysis of Ca^{2+}–calmodulin regulation in *Piceameyeri* pollen tube growth. *Plant Physiol.* **2009. 149 :** 1111-1126.

Chen X, Kim J. Callose synthesis in higher plants. *Plant Signal Behav.* **2009. 4 :** 489-492.

Cheung AY, Wang H, Wu HM. A floral transmitting tissue-specific glycoprotein attracts pollen tubes and stimulates their growth. *Cell.* **1995. 82 :** 383-393.

Cheung AY, Wu HM. Arabinogalactan proteins in plant sexual reproduction. *Protoplasma*. **1999. 208 :** 87-98.

Cheung AY, Wu HM. Structural and signaling networks for the polar cell growth machinery in pollen tubes. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* **2008. 59 :** 547-572.

Chevalier L, Bernard S, Ramdani Y, Lamour R, Bardor M, Lerouge P, Follet-Gueye ML, Driouich A. Subcompartment localization of the side chain xyloglucansynthesizing enzymes within Golgi stacks of tobacco suspension-cultured cells. *Plant J*. **2010. 64 :** 977-989.

Clark KR, Okuley JJ, Collins PD, Sims TL. Sequence variability and developmental expression of S-alleles in self-incompatible and pseudo-self- compatible petunia. *Plant Cell.* **1990. 2** : 815-826.

Clausen MH, Willats WGT, Knox JP. Synthetic methyl hexagalacturonate hapten inhibitors of anti-homogalacturonan monoclonal antibodies LM7, JIM5 and JIM7. *Carbohyd Res.* **2003. 338** : 1797-1800.

Clough SJ, Bent AF. Floral dip : a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **1998. 16 :** 735-743.

Coiffard C, Gomez B, Daviero-Gomez V, Dilcher DL. Rise to dominance of angiosperm pioneers in European Cretaceous environments. *PNAS.* **2012. 51 :** 20955-20959.

Coimbra S, Salema R. Immunolocalization of arabinogalactan proteins in *Amaranthus* hypochondriacus L. ovules. *Protoplasma*. **1997. 199 :** 75-82.

Coimbra S, Duarte C. Arabinogalactan proteins may facilitate the movement of pollen tubes from the stigma to the ovules in *Actinidia* deliciosa and *Amaranthus* hypochondriacus. *Euphytica*. **2003. 133 :** 171-178.

Coimbra S, Almeida J, Junqueira V, Costa ML, Pereira LG. Arabinogalactan proteins as molecular markers in *Arabidopsis thaliana* sexual reproduction*. J Exp Bot.* **2007. 58 :** 4027-4035.

Coimbra S, Jones B, Pereira LG. Arabinogalactan proteins (AGPs) related to pollen tube guidance into the embryo sac in *Arabidopsis*. *Plant Signal Behav.* **2008. 3 :** 455-456.

Coimbra S, Costa M, Jones B, Mendes MA, Pereira LG. Pollen grain development is compromised in *Arabidopsis agp6 agp11* null mutants. *J Exp Bot*. **2009. 60 :** 3133-3142.

Coimbra S, Costa M, Mendes MA, Pereira AM, Pinto J, Pereira LG. Early germination of *Arabidopsis* pollen in a double null mutant for the arabinogalactan protein genes *AGP6* and *AGP11*. *Sex Plant Reprod.* **2010. 23 :** 199-205.

Coimbra S, Pereira LG. Arabinogalactan proteins in *Arabidopsis thaliana* pollen development, transgenic plants - Advances and Limitations, PhD. Yelda Ozden Çiftçi (Ed.), ISBN: 978-953-51-0181-9, *InTech*. **2012.** 329-352.

Cosgrove DJ, Bedinger P, Durachko DM. Group 1 allergens of grass pollen as cell wall-loosening agents. *PNAS.* **1997. 94 :** 6559-6564.

Cosgrove DJ. Growth of the plant cell wall. *Nature Rev Mol Cell Biol.* **2005. 6 :** 850-861.

Costa M, Pereira AM, Rudall PJ, Coimbra S. Immunolocalization of arabinogalactan proteins (AGPs) in reproductive structures of an early-divergent angiosperm, *Trithuria* (Hydatellaceae). *Ann. Bot.* **2013. 111 :** 183-190.

D.

D'Avino R, Camardella L, Christensen TMIE, Giovane A, Servillo L. Tomato pectin methylesterase: modeling, fluorescence, and inhibitor interaction studies-comparison with the bacterial (*Erwinia chrysanthemi*) enzyme. *Proteins*. **2003. 53 :** 830-839.

D'Erfurth I, Signor C, Aubert G, Sanchez M, Vernoud V, Darchy B, Lherminier J, Bourion V, Bouteiller N, Bendahmane A, Buitink J, Prosperi J, Thompson R, Burstin J, Gallardo K. A role for an endosperm-localized subtilase in the control of seed size in legumes. *New Phytol.* **2012. 196 :** 738-751.

Daher FB, Chebli Y, Geitmann A. Optimization of conditions for germination of cold-stored *Arabidopsis thaliana* pollen. *Plant Cell Reports*. **2009. 28 :** 347-357.

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

Dai S, Chen T, Chong K, Xue Y, Liu S, Wang T. Proteomics identification of differentially expressed proteins associated with pollen germination and tube growth reveals characteristics of germinated *Oryza sativa* pollen. *Mol Cell Proteomics.* **2007. 6 :** 207-230.

Dangl JL, Jones JD. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*. **2001. 411 :** 826-833.

Dardelle F, Lehner A, Ramdani Y, Bardor M, Lerouge P, Driouich A, Mollet JC. Biochemical and immunocytological characterization of *Arabidopsis* pollen tube cell wall. *Plant Physiol.* **2010. 153 :** 1563-1576.

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

De Nettancourt D. Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants. *Springer*. **2001. 3 :** ISBN: 978-3-642-08457-7.

De Rybel B, Van den Berg W, Lokerse A, Liao CY, Van Mourik H, Möller B, Peris CL, Weijers D. A versatile set of ligation-independent cloning vectors for functional studies in plants. *Plant Physiol*. **2011. 3** : 1292-1301.

Dearnaley JDW, Daggard GA. Expression of a polygalacturonase enzyme in germinating pollen of *Brassica napus*. *Sex Plant Reprod.* **2001. 13 :** 265-271.

Delmas F, Séveno M, Northey JG, Hernould M, Lerouge P, McCourt P, Chevalier C. 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.* **2008. 59 :** 2639-2647.

Demarty M, Morvan C, Thellier M. Calcium and the cell wall. *Plant Cell Environ*. **1984. 7 :** 441-448.

Deng Y Wang W Li WQ Xia C Liao HZ Zhang XQ Ye D. *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.* **2010. 52 :** 829-843.

Derksen J, Li YQ, Knuiman B, Guerts H. The wall of *Pinus sylvestris* pollen tubes. *Protoplasma.* **1999. 208** : 26-36.

Derksen J, Knuiman B, Hoedemaekers K, Guyon A, Bonhomme S, Pierson ES. Growth and cellular organization of *Arabidopsis* pollen tubes *in-vitro*. *Sex Plant Reprod*. **2002. 15 :** 133-139.

Dey PM, Del Campillo E. Biochemistry of the multiple forms of glycosidases in plants. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* **1984. 56 :** 141-249.

Di Matteo A, Giovan A, Raiola A, Camardella L, Bonivento D, De Lorenzo G, Cervone F, Bellincampi D, Tsernogloua D. Structural basis for the interaction between pectin methylesterase and a specific inhibitor protein. *Plant Cell*. **2005. 17 :** 849-858.

Dixit R, Rizzo C, Nasrallah ME, Nasrallah JB. The *Brassica MIP-MOD* gene encodes a functional water channel that is expressed in the stigma epidermis. *Plant Mol Biol.* **2001. 45 :** 51-62.

Doblin MS, De Melis L, Newbigin E, Bacic A, Read SM. Pollen tubes of *Nicotiana alata* express two genes from different β-glucan synthase families. *Plant Physiol.* **2001. 125 :** 2040-2052.

Doblin MS, Kurek I, Jacob-Wilk D, Delmer DP. Cellulose biosynthesis in plants : From genes to rosettes. *Plant Cell Physiol.* **2002. 43 :** 1407-1420.

Dong X, Hong Z, Sivaramakrishnan M, Mahfouz M, Verma DP. Callose synthase (*CalS5*) is required for exine formation during microgametogenesis and for pollen viability in *Arabidopsis*. *Plant J*. **2005. 42 :** 315-328.

Dowd PE, Coursol S, Skirpan AL, Kao TH, Gilroy S. *Petunia* phospholipase C1 is involved in pollen tube growth. *Plant Cell.* **2006. 18 :** 1438-1453.

Drakakaki G, Zabotina O, Delgado I, Robert S, Keegstra K, Raikhel N. *Arabidopsis* reversibly glycosylated polypeptides 1 and 2 are essential for pollen development. *Plant Physiol.* **2006. 142 :** 1480-1492.

Driouich A, Faye L, Staehelin LA. The plant Golgi apparatus: a factory for complex polysaccharides and glycoproteins. *Trends Biochem Sci.* **1993. 18 :** 210-214.

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

Du H, Simpson RJ, Moritz RL, Clarke AE, Bacic A. Isolation of the protein backbone of an arabinogalactan-protein from the styles of *Nicotiana alata* and characterization of a corresponding cDNA. *Plant Cell.* **1994. 6:** 1643-1653.

Duan Q, Kita D, Johnson EA, Aggarwal M, Gates L, Wu HM, Cheung AY. Reactive oxygen species mediate pollen tube rupture to release sperm for fertilization in *Arabidopsis*. *Nature Comm*. **2014. 5 :** 3129.

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

Durand C, Vicre-Gibouin M, Follet-Gueye ML, Duponchel L, Moreau M, Lerouge P, Driouich A. The organization pattern of root border-likes cells of *Arabidopsis thaliana* is dependent on cell wall homogalacturonan. *Plant Physiol.* **2009. 150 :** 1411-1421.

E.

Edlund AF, Swanson R, Preuss D. Pollen and stigma structure and function : the role of diversity in pollination. *Plant Cell.* **2004. 16 :** 84-97.

Egusa S, Kitaoka T, Igarashi K, Samejima M, Goto M, Wariishi H. Preparation and enzymatic behavior of surfactant-enveloped enzymes for glycosynthesis in nonaqueous aprotic media. *J Mol Catal B: Enzymatic*. **2010. 67 :** 225-230.

Elkins T, Hortsch M, Bieber AJ, Snow PM, Goodman CS. Drosophila fasciclin-I is a novel homophilic adhesion molecule that along with fasciclin-III can mediate cell sorting. *J Cell Biol*. **1990. 110 :** 1825-1832.

Endress PK, Igersheim A. The reproductive structures of the basal angiosperm *Amborella Trichopoda* (Amborellaceae). *Int J Plant Sci*. **2000. 161 :** 237-248.

Eschenfeldt WH, Lucy S, Millard CS, Joachimiak A, Mark ID. A family of LIC vectors for high-throughput cloning and purification of proteins. *High Throughput Protein Expression and Purification*. *Humana Press*. **2009. 498 :** 105-115.

Escobar-Restrepo J, Huck N, Kessler S, Gagliardini V, Gheyselinck J, Yang W, Grossniklaus U. The FERONIA receptor-like kinase mediates male-female interactions during pollen tube reception. *Science*. **2007. 317 :** 656-660.

Esquerré-Tugayé MT. Cell Surfaces in Plant-Microorganism Interactions : I. A Structural Investigation of Cell Wall Hydroxyproline-rich Glycoproteins Which Accumulate in Fungus-infected Plants. *Plant Physiol.* **1979. 64 :** 314-319.

F.

Fan LM, Wang YF, Wang H, Wu WH. *In-vitro Arabidopsis* pollen germination and characterization of the inward potassium currents in *Arabidopsis* pollen grain protoplasts. *J Exp Bot.* **2001. 52 :** 1603-1614.

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

Feijó JA, Sainhas J, Hackett GR, Kunkel JG, Hepler PK. Growing pollen tubes possess a constitutive alkaline band in the clear zone and a growth-dependent acidic tip. *J Cell Biol*. **1999. 3 :** 483-496.

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

Fincher GB, Sawyer WH, Stone BA. Chemical and physical properties of an arabinogalactan-peptide from wheat endosperm. *Biochem J*. **1974. 139 :** 535-545.

Fincher GB, Stone BA, Clarke AE. Arabinogalactan-proteins: structure, biosynthesis, and function. *Annu Rev Plant Physiol*. **1983. 34 :** 47-70.

Follet-Gueye ML, Mollet JC, Vicré-Gibouin M, Berbard S, Chevalier L, Plancot B, Dardelle F, Ramdani Y, Coimbra S, Driouich A. Immuno-glyco-imaging in plant cells: localization of cell wall carbohydrate epitopes and their biosynthesizing enzymes. *Appl Immuno*. **2012. 14 :** 297-321.

Francis KE, Lam SY, Copenhaver GP. Separation of *Arabidopsis* pollen tetrads is regulated by *QUARTET1*, a pectin methylesterase gene. *Plant Physiol.* **2006. 142 :** 1004-1013.

Frietsch S, Wang YF, Sladek C, Poulsen LR, Romanowsky SM, Schroeder JI, Harper JF. A cyclic nucleotide-gated channel is essential for polarized tip growth of pollen. *PNAS.* **2007. 104 :** 14531-14536.

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

Fry SC, Dumville JC, Miller JG. Fingerprinting of polysaccharides attacked by hydroxyl radicals *in vitro* and in the cell walls of ripening pear fruit. *Biochem J*. **2001. 357 :** 729-737.

Fry SC. Cell wall polysaccharide composition and covalent crosslinking. *Ann Plant Rev.* **2011. 41 :** 1-42.

G.

Gaspar YM, Johnson KL, McKenna JA, Bacic A, Schultz CJ. The complex structures of arabinogalactan-proteins and the journey towards a function. *Plant Mol Biol.* **2001. 47 :** 116-176.

Gaspar YM, Nam J, Schultz CJ, Lee L, Gilson PR, Gelvin SB, Bacic A. Characterization of the *Arabidopsis* lysine-rich arabinogalactan-protein *AtAGP17* mutant (*rat1*) that results in a decreased efficiency of *agrobacterium* transformation. *Plant Physiol.* **2004. 135 :** 2162-2171.

Ge W, Song Y, Zhang Y, Burlingame AL, Guo Y. Proteomic analysis of apoplastic proteins from germinating *Arabidopsis thaliana* pollen. *Biochim Biophys Acta.* **2011. 1814 :** 1964-1973.

Geisler M, Axelsen KB, Harper JF, Palmgren MG. Molecular aspects of higher plant P-type Ca^{2+}-ATPases, *Biochim Biophys Acta Biomembr*. **2000. 1465 :** 52-78.

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

Gibalová A, Reňák D, Matczuk K, Dupl'áková N, Cháb D, Twell D, Honys D. *At*bZIP34 is required for *Arabidopsis* pollen wall patterning and the control of several metabolic pathways in developing pollen. *Plant Mol Biol.* **2009. 70** : 581-601.

Gibeaut DM, Carpita NC. Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides. *FASEB J.* **1994. 8 :** 904-915.

Gille S, Hänsel U, Ziemann M, Pauly M. Identification of plant cell wall mutants by means of a forward chemical genetic approach using hydrolases. *PNAS.* **2009. 106 :** 14699-14704.

Gillmor CS, Lukowitz W, Brininstool G, Sedbrook JC, Hamann T, Poindexter P, Somerville C. Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Proteins Are Required for Cell Wall Synthesis and Morphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. **2005. 17 :** 1128-1140.

Gilson P, Gaspar YM, Oxley D, Youl JJ, Bacic A. *Na*AGP4 is an arabinogalactan protein whose expression is suppressed by wounding and fungal infection in *Nicotiana alata*. *Protoplasma.* **2001. 215 :** 128-139.

Giovane A, Servillo L, Balestrieri C, Quagliuolo L, La Ratta B, Loiudice R, Castaldo D. Purification and characterization of three forms of pectin methylesterase from tomato fruit. *J Food Biochem.* **1994. 17 :** 339-341.

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

Gnanasambandam R, Proctor A. Determination of pectin degree of esterification by diffuse reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Chem.* **2000. 68 :** 327-332.

Golovkin M, Reddy AS. A calmodulin-binding protein from *Arabidopsis* has an essential role in pollen germination. *PNAS*. **2003. 100 :** 10558-10563.

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

Goring D. The Search for Components of the Self-incompatibility Signalling Pathway(s) in *Brassica napus. Ann. Bot.* **2000. 85 :** 171-179.

Gou JY, Miller LM, Hou G, Yu XH, Chen XY, Liu CJ. Acetylesterase-mediated deacetylation of pectin impairs cell elongation, pollen germination and Plant reproduction. *Plant Cell.* **2012. 24 :** 50-65.

Gribaa A, Dardelle F, Lehner A, Rihouey C, Burel C, Ferchichi A, Driouich A, Mollet JC. Effect of water deficit on the cell wall of the date palm (*Phoenix dactylifera* 'Deglet nour', Arecales) fruit during development. *Plant Cell Environ*. **2013. 36 :** 1056-1070.

Guénin S, Mareck A, Rayon C, Lamour R, Ndong YA, Domon JM, Sénéchal F, Fournet F, Jamet E, Canut H, percoco G, Mouille G, Rolland A, Rustérucci C, Guerineau F, Van Wuytswinkel O, Gillet F, Driouich A, Lerouge P, Gutierrez L, Pelloux J. Identification of pectin methylesterase 3 as a basic pectin methylesterase isoform involved in adventitious rooting in *Arabidopsis thaliana. New phytol*. **2011. 192 :** 114-126.

Guerriero G, Fugelstad J, Bulone V. What do we really know about cellulose biosynthesis in Higher Plants? *J Integr Plant Biol.* **2010. 52 :** 161-175.

Guerriero G, Hausman JF, Cai G. No Stress! Relax! Mechanisms Governing Growth and Shape in Plant Cells. *Int J Mol Sci.* **2014. 15 :** 5094-5114.

H.

Hadfield KA, Bennett AB. Polygalacturonases: Many genes in search of a function. *Plant Physiol.* **1998. 117 :** 337-343.

Hallé F. Les plantes à l'égal de l'homme. *Dossier pour la science*. **2012. 77 :** 4-6**.**

Hamilton JM, Simpson DJ, Hyman SC, Ndimba BK, Slabas AR. Ara12 subtilisin-like protease from *Arabidopsis thaliana*: purification, substrate specificity and tissue localization. *Biochem J.* **2003. 370** : 57-67.

Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* **1983. 166 :** 557-580.

Hancock JT, Henson D, Nyirenda M, Desikan R, Harrison J, Lewis L, Hughes J, Neill SJ. Proteomic identification of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase as an inhibitory target of hydrogen peroxide in *Arabidopsis*. *Plant Physiol Biochem*. **2005. 43 :** 828-835.

Hao H, Chen T, Fan L, Li R, Wang X. 2, 6-dichlorobenzonitrile causes multiple effects on pollen tube growth beyond altering cellulose synthesis in *Pinus bungeana Zucc*. *PLoS ONE*. **2013. 8 :** 76660.

Harholt J, Suttangkakul A, Scheller HV. Biosynthesis of pectin. *Plant Physiol.* **2010. 153 :** 384-395.

Harper JF, Hong B, Hwang I, Guo HQ, Stoddard R, Huang JF, Palmgren MG, Sze H. A novel calmodulin-regulated Ca^{2+}-ATPase (*ACA2*) from *Arabidopsis* with an N-terminal autoinhibitory domain, *J Biol Chem*. **1998. 273 :** 1099-1106.

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

Hart DA, Kindel PK. Isolation and partial characterization of apiogalacturonans from the cell wall of Lemna minor. *Biochem J*. **1970. 116 :** 569-579.

Haworth WN. Molecular structure of cellulose and of amylase. *Nature.* **1932. 129 :** 365-365.

Hellens RP, Edwards EA, Leyland NR, Bean S, Mullineaux PM. pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Mol Biol.* **2000. 42 :** 819-832.

Hepler PK. Calcium : a central regulator of plant growth and development. *Plant Cell.* **2005. 17 :** 2142-2155.

Hepler PK, Kunkel JG, Rounds CM, Winship LJ. Calcium entry into pollen tubes. *Trends Plant Sci.* **2012. 17 :** 32-38.

Hepler PK, Winship LJ. The pollen tube clear zone: Clues to the mechanism of polarized growth. *J Integr Plant Biol.* **2015. 57 :** 79-92.

Hesse M, Halbritter H, Zetter R, Weber M, Buchner R, Frosch-Radivo A, Ulrich S. Pollen Terminology - An illustrated handbook. Dans M. Hesse, ed, *Springer-Verlag, Vienne.* **2009.** pp 5-261.

Higashiyama T, Kuroiwa H, Kawano S, Kuroiwa T. Guidance *in-vitro* of the pollen tube to the naked embryo sac of *torenia fournieri*. *Plant Cell.* **1998. 10 :** 2019-2032.

Higashiyama T, Yabe S, Sasaki N, Nishimura Y, Miyagishima S, Kuroiwa H, Kuroiwa T. Pollen tube attraction by the synergid cell. *Science.* **2001. 293 :** 1480-1483.

Higginson T, Li SF, Parish RW. *AtMYB103* regulates tapetum and trichome development in *Arabidopsis thaliana. Plant J.* **2003. 35 :** 177-192.

Hird DL, Worrall D, Hodge R, Smartt S, Paul W Scott R. The anther-specific protein encoded by the *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana A6* gene displays similarity to beta-1,3-glucanases. *Plant J.* **1993. 4 :** 1023-1033.

Hong Z, Delauney AJ, Verma DP. A cell plate-specific callose synthase and its interaction with phragmoplastin. *Plant Cell.* **2001. 13 :** 755-768.

Honys D, Twell D. Transcriptome analysis of haploid male gametophyte development in *Arabidopsis. Genome Biol.* **2004. 5 :** 85.

Hothorn M, Bonneau F, Greiner S, Scheffzek K. Bacterial expression, purification and preliminary X-ray crystallographic characterization of the invertase inhibitor *Nt-CIF* fromm tobacco. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **2003. 59 :** 2279-2282.

Hothorn M, D'Angelo I, Márquez JA, Greiner S, Scheffzek K. The invertase inhibitor *Nt*-CIF from *Tobacco*: A highly thermostable four-helix bundle with an unusual N-terminal extension. *J Mol Biol.* **2004a. 335 :** 987-995.

Hothorn M, Wolf S, Aloy P, Greiner S, Scheffzek K. Structural insights into the target specificity of plant invertase and pectin methylesterase inhibitory proteins. *Plant Cell*. **2004b. 16 :** 3437-3447.

Hothorn M, Van den Ende W, Lammens W, Rybin V, Scheffzek K. Structural insights into the pH-controlled targeting of plant cell-wall invertase by a specific inhibitor protein. *PNAS.* **2010. 107 :** 17427-17432.

Hruba P, Honys D, Twell D, Capkova V, Tupy J. Expression of beta-galactosidase and beta-xylosidase genes during microspore and pollen development. *Planta.* **2005. 220 :** 931-940.

Hruz T, Laule O, Szabo G, Wessendorp F, Bleuler S, Oertle L, Widmayer P, Gruissem W, Zimmermann P. Genevestigator v3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Adv bioinformatics.* **2008 :** doi : 10.1155/2008/420747.

Hu J, Wang Z, Zhang L, Sun MX. The *Arabidopsis Exine Formation Defect* (*EFD*) gene is required for primexine patterning and is critical for pollen fertility. *New Phytol*. **2014. 203 :** 140-154.

Huang L, Cao J, Ye Y, Zhang Y, Zhang A, Liu T. The polygalacturonase gene *BcMF2* from *Brassica campestris* is associated with intine development. *J Exp Bot.* **2009a. 60 :** 301-313.

Huang L, Ye Y, Zhang Y, Zhang A, Liu T, Cao J. BcMF9, a novel polygalacturonase gene, is required for both *Brassica campestris* intine and exine formation. *Ann. Bot.* **2009b. 104 :** 1339-1351.

Hwang I, Sze H, Harper JF. A calcium-dependent protein kinase can inhibit a calmodulin-stimulated Ca^{2+} pump (*ACA2*) located in the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis*. *PNAS.* **2000. 97**: 6224-6229.

I.

Indriolo E, Safavian D, Goring DR. The ARC1 E3 ligase promotes two different self-pollen avoidance traits in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. **2014. 26 :** 1525-1543.

Ishikawa F, Suga S, Uemura T, Sato MH, Maeshima M. Novel type aquaporin SIPs are mainly localized to the ER membrane and show cellspecific expression in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **2005. 579 :** 5814-5820.

Ito T, Nagata N, Yoshiba Y, Ohme-takagi M, Ma H, Shinozaki K. *Arabidopsis MALE STERILITY1* encodes a PHD-type transcription factor and regulates pollen and tapetum development. *Plant Cell.* **2007. 19 :** 3549-3562.

Ivanov R, Gaude T. Endocytosis and endosomal regulation of the S-receptor kinase during the self-incompatibility response in *Brassica oleracea*. *Plant Cell*. **2009. 21 :** 2107-2117.

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

Iwai H, Hokura A, Oishi M, Chida H, Ishii T, Sakai S, Satoh S. The gene responsible for borate cross-linking of pectin Rhamnogalacturonan-II is required for plant reproductive tissue development and fertilization. *PNAS.* **2006. 103 :** 16592-16597.

Iwano M, Shiba H, Miwa T, Che FS, Takayama S, Nagai T, Miyawaki A, Isogai A. Ca^{2+} dynamics in a pollen grain and papilla cell during pollination of Arabidopsis. *Plant physiol.* **2004. 136 :** 3562-3571.

Iwano M, Entani T, Shiba H, Kakita M, Nagai T, Mizuno H, Miyawaki A, Shoji T, Kubo K, Isogai A, Takayama S. Fine-tuning of the cytoplasmic Ca^{2+} concentration is essential for pollen tube growth. *Plant Physiol*. **2009. 150 :** 1322-1334.

J.

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

Jang JY, Kim DG, Kim YO, Kim JS, Kang H. An expression analysis of a gene family encoding plasma membrane aquaporins in response to abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol.* **2004. 54 :** 713-725.

Jarvis MC, Briggs SPH, Knox JP. Intercellular adhesion and cell separation in plants. *Plant Cell Environ.* **2003. 26 :** 977-989.

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

Jensen JK, Sørensen SO, Harholt J, Geshi N, Sakuragi Y, Møller I, Zandleven J, Bernal AJ, Jensen NB, Sørensen C. Identification of a xylogalacturonan xylosyltransferase involved in pectin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **2008. 20 :** 1289-1302.

Jiang J, Zhang Z, Cao J. Pollen wall development: the associated enzymes and metabolic pathways. *Plant Biol*. **2013. 15 :** 249-263.

Jiang J, Yao L, Yu Y, Lv M, Miao Y, Cao J. *PECTATE LYASE-LIKE10* is associated with pollen wall development in *Brassica campestris*. *J Integr Plant Biol*. **2014. 56 :** 1095-1105.

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

Jimenez-Durán K, McClure B, García-Campusano F, Rodriguez-Sotres R, Cisneros J, Busot G, Cruz-García F. *Na*StEP: a proteinase inhibitor essential to self-incompatibility and a positive regulator of HT-B stability in *Nicotiana alata* pollen tubes. *Plant Physiol.* **2013. 161 :** 97-107.

Jin Y, Tashpulatov AS, Katholnigg H, Heberle-Bors E, Touraev A. Isolation and characterization of two wheat β-expansin genes expressed during male gametophyte development. *Protoplasma.* **2006. 228 :** 13-19.

Johansson K, El-Ahmad M, Friemann R, Jörnvall H, Markovic O, Eklund H. Crystal structure of plant pectin methylesterase. *FEBS Lett.* **2002. 514 :** 243-249.

Johnson KL, Jones BJ, Schultz CJ, Bacic A. Non enzymic cell wall (glyco)proteins. *Plant Cell Wall.* **2003. 8 :** 111-154.

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

Jolie RP, Duvetter T, Houben K, Vandevenne E, Van Loey AM, Declerck PJ, Hendrickx ME, Gils A. Plant pectin methylesterase and its inhibitor from kiwi fruit: Interaction analysis by surface plasmon resonance. *Food Chem*. **2010. 121 :** 207-214.

Jones L, Seymour GB, Knox JP. Localization of pectic galactan in tomato cell walls using a monoclonal antibody specific to (1→4)-β-D-galactan. *Plant Physiol*. **1997. 113 :** 1405-1412.

K.

Kachroo A, Nasrallah ME, Nasrallah JB. Self-incompatibility in the *Brassicaceae*. *Plant Cell*. **2002. 14 :** 227-238.

Kammerloher W, Fischer U, Piechottka GP, Schäffner AR. Water channels in the plant plasma membrane cloned by immunoselection from a mammalian expression system. *Plant J.* **1994. 6 :** 187-199.

Kandasamy MK, Nasrallah J.B, Nasrallah ME. Pollen-pistil interactions and developmental regulation of pollen tube growth in *Arabidopsis*. *Development.* **1994**. **120 :** 3405-3418.

Kaya H, Nakajima R, Iwano M, Kanaoka MM, Kimura S, Takeda S, Kawarazaki T, Senzaki E, Hamamura Y, Higashiyama T, Takayama S, Abe M, Kuchittsu K. Ca^{2+}-activated reactive oxygen species production by Arabidopsis RbohH and RbohJ is essential for proper pollen tube tip growth. *Plant Cell*. **2014. 26 :** 1069-1080.

Kessler SA, Shimosato-Asano H, Keinath NF, Wuest SE, Ingram G, Panstruga R, Grossniklaus U. Conserved molecular components for pollen tube reception and fungal invasion. *Science*. **2010. 330 :** 968-971.

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

Kieliszewski MJ, Lamport DT, Tan L, Cannon MC. Hydroxyproline-rich glycoproteins : forms and function. *Annu Plant Rev.* **2011. 41 :** 321-336.

Kim J, Shiu SH, Thoma S, Li WH, Patterson SE. Patterns of expansion and expression divergence in the plant polygalacturonase gene family. *Genome Biol.* **2006. 7 :** 1-14.

Kitashiba H, Nasrallah JB. Self-incompatibility in *Brassicaceae* crops: lessons for interspecific incompatibility. *Breed Sci.* **2014. 64 :** 23-37.

Klavons JA, Bennett AD. Determination of methanol using alcohol oxidase and its application to methyl ester content of pectins. *J Agri Food Chem.* **1986. 34 :** 597-599.

Ko J, Han K, Park S, Yang J. Plant body weight-induced secondary growth in *Arabidopsis* and its transcription phenotype revealed by whole-transcriptome profiling. *Plant Physiol.* **2004. 135 :** 1069-1083.

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

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

Komarova TV, Sheshukova EV, Dorokhov YL. Cell wall methanol as a signal in plant immunity. *Front Plant Sci*. **2014. 5.**

Kondo K, Yamamoto M, Matton DP, Sato T, Hirai M, Norioka S, Hattori T, Kowyama Y. Cultivated tomato has defects in both S-RNase and HT genes required for stylar function of self-incompatibility. *Plant J*. **2002. 29 :** 627-636.

Kong Y, Zhou G, Yin Y, Xu Y, Pattathil S, Hahn MG. Molecular analysis of a family of *Arabidopsis* genes related to galacturonosyltransferases. *Plant Physiol.* **2011. 155 :** 1791-1805.

Konishi T, Takeda T, Miyazaki Y, Ohnishi-Kameyama M, Hayashi T, O'Neill MA, Ishii T. A plant mutase that interconverts UDP-arabinofuranose and UDP-arabinopyranose. *Glycobiology.* **2007. 17 :** 345-354.

Konrad KR, Wudick MM, Feijó JA. Calcium regulation of tip growth: new genes for old mechanisms. *Curr Opin Plant Biol*. **2011. 14 :** 721-730.

Kotake T, Li YQ, Takahashi M, Sakurai N. Characterization and function of wall-bound exo-beta-glucanases of *Lilium longiflorum* pollen tubes. *Sex Plant Reprod.* **2000. 13 :** 1-9.

Kremers GJ, Goedhart J, van Munster EB, Gadella TW. Cyan and yellow super fluorescent proteins with improved brightness, protein folding, and FRET Förster radius. *Biochemistry*. **2006. 45 :** 6570-6580.

Kubo KI, Entani T, Takara A, Wang N, Fields AM, Hua Z, Toyoda M, Kawashima S, Ando T, Isogai A, Kao T, Takayama S. Collaborative non-self recognition systemin S-RNase-based self- incompatibility. *Science.* **2010. 330 :** 796-799.

Kudla J, Batistiç O, Hashimoto K. Calcium signals: the lead currency of plant information processing. *Plant Cell*. **2010. 22 :** 541-563.

Kulikauskas R, McCormick S. Identification of the *tobacco* and *Arabidopsis* homologues of the pollen-expressed *LAT59* gene of tomato. *Plant Mol Biol.* **1997. 34 :** 809-814.

Kurasawa K, Matsui A, Yokoyama R, Kuriyama T, Yoshizumi T, Matsui M, Suwabe K, Watanabe M, Nishitani K. The *AtXTH28* gene, a xyloglucan endotransglucosylase / hydrolase, is involved in automatic self-pollination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **2009. 50 :** 413-422.

L.

Lai Z, Ma WS, Han B, Liang LZ, Zhang YS, Hong GF, Xue Y. An F-box gene linked to the self-incompatibility (*S*) locus of *Antirrhinum* is expressed specifically in pollen and tapetum. *Plant Mol Biol.* **2002. 50 :** 29-42.

Lalanne E, Honys D, Johnson A, Borner GH, Lilley KS, Dupree P, Grossniklaus U, Twell D. *SETH1* and *SETH2*, two components of the glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthetic pathway, are required for pollen germination and tube growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. **2004. 16 :** 229-240.

Lamport DT, Katona L, Roerig S. Galactosylserine in extensin. *Biochem J*. **1973. 133 :** 125-132.

Lamport DT, Kieliszewski MJ, Chen Y, Cannon MC. Role of the extension superfamily in primary cell wall architecture. *Plant Physiol.* **2011. 156 :** 11-19.

Lampugnani ER, Mollet IE, Cassin A, Jones DF, Koh PL, Ratnayake S, Beahan CT, Wilson SM, Bacic A. *In-vitro* grown pollen tubes of *Nicotiana alata* actively synthesise a fucosylated xyloglucan. *PLoS ONE*. **2013. 8** : 77140.

Lang V, Usadel B, Obermeyer G. *De novo* sequencing and analysis of the lily pollen transcriptome : an open access data source for an orphan plant species. *Plant Mol Biol.* **2015. 87 :** 69-80.

Larionov A, Krause A, Miller W. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. *BMC Bioinformatics.* **2005. 6 :** 1-16.

Lee HS, Huang SS, Kao TH. *S* proteins control rejection of incompatible pollen in *Petunia inflata*. *Nature.* **1994. 367 :** 560-563.

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

Lennon KA, Roy S, Hepler PK, Lord EM. The structure of the transmitting tissue of *Arabidopsis thaliana* (*L.*) and the path of pollen tube growth. *Sex Plant Reprod.* **1998**. **11 :** 49-59.

Lennon KA, Lord EM. *In-vivo* pollen tube cell of *Arabidopsis thaliana* I. Tube cell cytoplasm and wall. *Protoplasma*. **2000. 214 :** 45-56.

Leroux C, Bouton S, Kiefer-Meyer MC, Ndinyanka Fabrice T, Mareck A, Guénin S, Fournet F, Ringli C, Pelloux J, Driouich A, Lerouge P, Lehner A, Mollet JC. *PECTIN METHYLESTERASE48* is involved in *Arabidopsis* pollen grain germination. *Plant Physiol*. **2015. 167 :** 347-380.

Lerouxel O, Choo TS, Séveno M, Usadel B, Faye L, Lerouge P, Pauly M. Rapid structural phenotyping of plant cell wall mutants by enzymatic oligosaccharide fingerprinting. *Plant Physiol.* **2002. 130 :** 1754-1763.

Li M, Xiong G, Li R, Cui J, Tang D, Zhang B, Pauly M, Cheng Z, Zhou Y. *Rice cellulose synthase-like D4* is essential for normal cell-wall biosynthesis and plant growth. *Plant J*. **2009. 60 :** 1055-1069.

Li MZ, Elledge SJ. Harnessing homologous recombination *in-vitro* to generate recombinant DNA *via* SLIC. *Nature methods*. **2007. 4 :** 251-256.

Li SF, Higginson T, Parish RW. A novel *MYB-related* gene from *Arabidopsis thaliana* expressed in development anthers. *Plant Cell Physiol*. **1999. 40 :** 343-347.

Li SX, Showalter AM. Cloning and developmental/stress-regulated expression of a gene encoding a tomato arabinogalactan protein. *Plant Mol Biol.* **1996. 32 :** 641-652.

Li T, Choi WG, Wallace IS, Baudry J, Roberts DM. *Arabidopsis thaliana NIP7;1:* an anther-specific boric acid transporter of the aquaporin superfamily regulated by an unusual tyrosine in helix 2 of the transport pore. *Biochemistry.* **2011. 50 :** 6633-6641.

Li YQ, Chen F, Linskens HF, Cresti M. Distribution of unesterified and esterified pectins in cell walls of pollen tubes of flowering plants. *Sex Plant Reprod.* **1994. 7 :** 145-152.

Li YQ, Faleri C, Geitmann A, Zhang HQ, Cresti M. Immunogold localization of arabinogalactan proteins, unesterified and esterified pectins in pollen grains and pollen tubes of *Nicotiana tabacum L*. *Protoplasma*. **1995. 189 :** 26-36.

Li YQ, Mareck A, Faleri C, Moscatelli A, Liu Q, Cresti M. Detection and localization of pectin methylesterase isoforms in pollen tubes of *Nicotiana tabacum L*. *Planta*. **2002. 214 :** 734-740.

Li ZC, Durachko DM, Cosgrove DJ. An oat coleoptile wall protein that induces wall extension *in-vitro* and that is antigenically related to a similar protein from cucumber hypocotyls. *Planta.* **1993**. *191* : 349-356.

Liepman AH, Wightman R, Geshi N, Turner SR, Scheller HV. *Arabidopsis* - a powerful model system for plant cell wall research. *Plant J.* **2010. 61 :** 1107-1121.

Lind JL, Bönig I, Clarke AE, Anderson MA. A style-specific 120 kDa glycoprotein enters pollen tubes of *Nicotiana alata in-vivo*. *Sex Plant Reprod.* **1996. 9 :** 75-86.

Lindner H, Kessler SA, Müller LM, Shimosato-Asano H, Boisson-dernier A, Grossniklaus U. TURAN and EVAN mediate pollen tube reception in Arabidospis synergides through protein glycosylation. *PLoS Biol*. **2015.** doi : 10.1371/journal.pbio.1002139.

Lindsay SE, Fry SC. Control of diferulate formation in dicotyledonous and gramineous cell-suspension cultures. *Planta*. **2008. 227 :** 439-452.

Link M, Rausch T, Greiner S. In *Arabidopsis thaliana*, the invertase inhibitors *AtC/VIF1* and *2* exhibit distinct target enzyme specificities and expression profiles. *FEBS Lett.* **2004. 573** : 105-109.

Lionetti V, Raiola A, Camardella L, Giovane A, Obel N, Pauly M, Favaron F, Cervone F, Bellincampi D. Overexpression of pectin methylesterase inhibitors in *Arabidopsis* restricts fungal infection by *Botrytis cinerea. Plant Physiol.* **2007**. 143 : 1871-1880.

Liszkay A, Van der Zalm E, Schopfer P. Production of reactive oxygen intermediates ($O^{\cdot}_2$, H_2O_2, and ·OH) by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth. *Plant Physiol.* **2004. 136 :** 3114-3123.

Liu J, Zhang Y, Qin G, Tsuge T, Sakaguchi N, Luo G, Sun K, Shi D, Aki S, Zheng N, Aoyama T, Oka A, Yang W, Umeda M, Xie Q, Gu H, Qu LJ. Targeted degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor *ICK4/KRP6* by RING-type E3 ligases is essential for mitotic cell cycle progression during *Arabidopsis* gametogenesis. *Plant Cell*. **2008. 20 :** 1538-1554.

Liu JX, Howell SH. Endoplasmic reticulum protein quality control and its relationship to environmental stress responses in plants. *Plant Cell*. **2010a. 22 :** 2930-2942.

Liu JX, Howell SH. *bZIP28* and *NF-Y* transcription factors are activated by ER stress and assemble into a transcriptional complex to regulate stress response genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. **2010b. 22 :** 782-796.

Liu XL, Liu L, Niu QK, Xia C, Yang KZ, Li R, Chen LQ, Zhang XQ, Zhou Y, Ye D. *MALE GAMETOPHYTE DEFECTIVE 4* encodes a rhamnogalacturonan II xylosyltransferase and is important for growth of pollen tubes and roots in *Arabidopsis*. *Plant J.* **2011. 65 :** 647-660.

Liu W, Fan J, Li J, Song Y, Li Q, Zhang YE, Xue Y. *SCFSLF*-mediated cytosolic degradation of S-RNase is required for cross-pollen compatibility in S-RNase-based self-incompatibility in *Petunia hybrida*. *Front Genet*. **2014. 5.** 228-228.

Liu ZT, Fan X, Wua J, Zhang L, Song L, Gao Z, Dong W, Xiong H, Peng Y, Tang S. A green route to prepare cellulose acetate particle from ramie fiber. *React Funct Polym.* **2007. 67 :** 104-112.

Loraine AE, McCormick S, Estrada A, Patel K, Qin P. RNA-Seq of *Arabidopsis* pollen uncovers novel transcription and alternative splicing. *Plant Physiol.* **2013. 162** : 1092-1109.

Lord EM. Adhesion and cell movement during pollination. *Trends Plant Sci.* **2000. 5 :** 368-373.

Lord EM. Adhesion molecules in lily pollination. *Sex Plant Reprod.* **2001. 14 :** 57-62.

Lord EM, Russell SD. The mechanisms of pollination and fertilization in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **2002. 18 :** 81-105.

Lou Y, Xu XF, Zhu J, Gu JN, Blackmore S, Yang ZN. The tapetal *AHL* family protein *TEK* determines nexine formation in the pollen wall. *Nature Comm*. **2013. 5.** 3855-3855.

Louvet R, Cavel E, Gutierrez L, Guénin S, Roger D, Gillet F, Guerineau F, Pelloux J. Comprehensive expression profiling of the pectin methylesterase gene family during silique development in *Arabidopsis thaliana. Planta.* **2006. 224 :** 782-791.

Lu P, Chai M, Yang J, Ning G, Wang G, Ma H. The *Arabidopsis CALLOSE DEFECTIVE MICROSPORE1* gene is required for male fertility through regulating callose metabolism during microsporogenesis. *Plant physiol.* **2014. 164 :** 1893-1904.

Luu DT, Qin X, Morse D, Cappadocia M. S-RNase uptake by compatible pollen tubes in gametophytic self-incompatibility. *Nature.* **2000. 407 :** 649-651.

Lyssenko NN, Hanna-Rose W, Schlegel RA. Competing interests statement. *BioTechniques*. **2007. 43:** 596-600.

M.

Ma W, Berkowitz GA. Ca^{2+} conduction by plant cyclic nucleotide gated channels and associated signaling components in pathogen defense signal transduction cascades. *New Phytol*. **2011. 190 :** 566-572.

Majewska-Sawka A, Nothnagel EA. The multiple roles of arabinogalactan proteins in plant development. *Plant Physiol.* **2000. 122 :** 3-10.

Manrique GD, Lajolo FM. FT-IR spectroscopy as a tool for measuring degree of methyl esterification in pectins isolated from ripening papaya fruit. *Postharvest Biol Techn*. **2002. 25 :** 99-107.

Markovič O, Janeček Š. Pectin methylesterases: sequence-structural features and phylogenetic relationships. *Carbohyd Res*. **2004. 339 :** 2281-2295.

Marin-Olivier M, Chevalier T, Fobis-Loisy I, Dumas C, Gaude T. *Aquaporin PIP* genes are not expressed in the stigma papillae in *Brassica napus*. *Plant J.* **2000. 24 :** 231-240.

Marin-Rodriguez MV, Orchard J, Seymour GB. Pectate lyases, cell wall degradation and fruit softening. *J Exp Bot.* **2002. 53 :** 2115-2119.

Márton ML, Cordts S, Broadhvest J, Dresselhaus T. Micropylar pollen tube guidance by egg apparatus 1 of maize. *Science.* **2005. 307 :** 573-576.

Matoh T, Takasaki M, Takabe K, Kobayashi M. Immunocytochemistry of rhamnogalacturonan II in cell walls of higher plants. *Plant Cell Physiol.* **1998**. **39** : 483-491.

Matsunaga T, Ishii T, Matsumoto S, Higuchi M, Darvill A, Albersheim P, O'Neill MA. Occurrence of the primary cell wall polysaccharide rhamnogalacturonan II in pteridophytes, lycophytes, and bryophytes. Implications for the evolution of vascular plants. *Plant Physiol.* **2004. 134 :** 339-351.

McCann MC, Wells B, Roberts K. Direct visualization of cross-links in the primary plant cell wall. *J Cell Sci*. **1990. 96 :** 323-334.

McCann MC, Carpita NC. Designing the deconstruction of plant cell walls. *Curr Opin Plant Biol.* **2008. 11 :** 314-320.

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

McCormick S. Control of male gametophyte development. *Plant Cell*. **2004. 16 :** 142-153.

McClure BA, Haring V, Ebert PR, Anderson MA, Simpson RJ, Sakiyama F, Clarke AE. Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana alata* are ribonucleases. *Nature.* **1989. 342 :** 955-957.

McClure BA, Mou B, Canevascini S, Bernatzky R. A small asparagine-rich protein required for S-allele-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *PNAS.* **1999. 96** : 13548-13553.

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

McQueen-Mason S, Cosgrove DJ. Disruption of hydrogen bonding between plant cell wall polymers by proteins that induce wall extension. *PNAS.* **1994. 91 :** 6574-6578.

McQueen-Mason S, Cosgrove DJ. Expansin mode of action on cell walls. Analysis of wall hydrolysis, stress relaxation, and binding. *Plant Physiol.* **1995. 107:** 87-100.

Michard E, Alves F, Feijó JA. The role of ion fluxes in polarized cell growth and morphogenesis: the pollen tube as an experimental paradigm. *Int J Dev Biol.* **2009. 53 :** 1609-1622.

Michard E, Lima PT, Borges F, Silva AC, Portes MT, Carvalho J, Gilliham M, Liu LH, Obermeyer G, Feijo J. Glutamate receptor-like genes form Ca channels in pollen tubes and are regulated by pistil D-serine. *Science*. **2011. 332:** 434-437**.**

Micheli F, Holliger C, Goldberg R and Richard L. Characterization of the *pectin methylesterase-like* gene *AtPME3* : a new member of a gene family comprising at least 12 genes in *Arabidopsis thaliana. Gene.* **1998. 220 :** 13-20.

Micheli F. Pectin methylesterases : cell wall enzymes with important roles in Plant Physiol. *Trends plant Sci.* **2001. 6 :** 414-419.

Minic Z, Jamet E, San-Clemente H, Pelletier S, Renou J, Rihouey C, Okinyo DP, Proux C, Lerouge P, Jouanin L. Transcriptomic analysis of *Arabidopsis* developing stems: a close-up on cell wall genes. *BMC Plant Biol.* **2009**. **9** : 1-17.

Mohnen D. Pectin structure and biosynthesis. *Curr Opin Plant Biol.* **2008. 11 :** 266-277.

Mollet JC, Park SY, Nothnagel EA, Lord EM. A lily stylar pectin is necessary for pollen tube adhesion to an *in-vitro* stylar matrix. *Plant Cell.* **2000. 12 :** 1737-1749.

Mollet JC, Kim S, Jauh GY, Lord EM. AGPs, pollen tube growth and the reversible effects of Yariv phenylglycoside. *Protoplasma.* **2002. 219 :** 89-98.

Mollet JC, Faugeron C, Morvan H. Cell adhesion, separation and guidance in compatible plant reproduction. *Annu Plant Rev.* **2007. 25 :** 69-90.

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

Moscatelli A, Idilli AI. Pollen tube growth : A delicate equilibrium between secretory and endocytic pathways. *J Integr Plant Biol.* **2009. 51 :** 727-739.

Mouille G, Ralet MC, Cavelier C, Eland C, Effroy D, Hématy K, McCartney L, Truong HN, Gaudon V, Thibault JF, Marchant A, Höfte H. Homogalacturonan synthesis in *Arabidopsis thaliana* requires a Golgi-localized protein with a putative methyltransferase domain. *Plant J*. **2007. 50 :** 605-614.

Mouline K, Véry AA, Boucherez GFJ, Pilot G, Devic M, Bouchez D, Thibaud JB, Sentenac H. Pollen tube development and competitive ability are impaired by disruption of a Shaker K^+ channel in Arabidopsis. *Genes Dev*. **2002. 16 :** 339-350.

Mueller SC, Brown Jr RM. Evidence for an intramembrane component associated with a cellulose microfibril-synthesizing complex in higher plants. *J Cell Biol.* **1980. 84 :** 315-326.

Müller K, Levesque-Tremblay G, Bartels S, Weitbrecht K, Wormit A, Usadel B, Haughn G, Kermode AR. Demethylesterification of cell wall pectins in *Arabidopsis* plays a role in seed germination. *Plant Physiol.* **2013. 161 :** 305-316.

Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with *tobacco* tissue cultures. *Plant Physiol.* **1962. 15 :** 473-497.

Murfett J, Atherton TL, Mou B, Gasser CS, McClure BA. S-RNase expressed in transgenic *Nicotiana* causes *S*-allele-specific pollen rejection. *Nature.* **1994. 367 :** 563-566.

N.

Nam J, Mysore KS, Zheng C, Knue MK, Matthysse AG, Gelvin SB. Identification of T-DNA tagged *Arabidopsis* mutants that are resistant to transformation by *Agrobacterium*. *Mol Gen Genet*. **1999. 261 :** 429-438.

Nasrallah JB, Nasrallah ME. Pollen–stigma signalling in the sporophytic self-incompatibility response. *Plant Cell.* **1993. 5 :** 1325-1335.

Nguema-Ona E, Andème-Onzighi C, Aboughe-Angone S, Bardor M, Ishii T, Lerouge P, Driouich A. The *reb1-1* mutation of *Arabidopsis*. Effect on the structure and localization of galactose-containing cell wall polysaccharides. *Plant physiol*. **2006. 140 :** 1406-1417.

Nguema-Ona E, Bannigan A, Chevalier L, Baskin TI, Driouich A. Disruption of arabinogalactan proteins disorganizes cortical microtubules in the root of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **2007. 52 :** 240-251.

Nguema-Ona E, Coimbra S, Vicré-Gibouin M, Mollet JC, Driouich A. Arabinogalactan-proteins in root and pollen tube cells : Distribution and functional aspects. *Ann. Bot.* **2012. 110 :** 383-404.

Nishikawa S, Zinkl GM, Swanson RJ, Maruyama D, Preuss D. Callose (beta-1,3 glucan) is essential for *Arabidopsis* pollen wall patterning, but not tube growth. *BMC Plant Biol.* **2005. 5 :** 22-32.

Nishimura MT, Stein M, Hou B, Vogel JP, Edwards H, Somerville SC. Loss of a callose synthase results in salicylic acid-dependent disease resistance. *Science.* **2003. 301:** 969-972.

Nothnagel EA. Proteoglycans and related components in plant cells. *Int Rev Cytol Survey Cell Biol.* **1997. 174:** 195-291.

O.

Obel N, Erben V, Schwarz T, Kühnel S, Fodor A, Pauly M. Microanalysis of plant cell wall polysaccharides. *Mol Plant*. **2009. 2 :** 922-932.

O'Brien M, Kapfer C, Major G, Laurin M, Bertrand C, Kondo K, Kowyama Y, Matton DP. Molecular analysis of the stylar-expressed *Solanum chacoense* small asparagine-rich protein family related to the HT modifier of gametophytic self-incompatibility in *Nicotiana*. *Plant J.* **2002. 32 :** 985-996.

Okuda S, Tsutsui H, Shiina K, Sprunck S, Takeuchi H, Yui R, Kasahara RD, Hamamura Y, Mizukami A, Susaki D. Defensin-like polypeptide LUREs are pollen tube attractants secreted from synergid cells. *Nature.* **2009. 458 :** 357-361.

Okuda S, Higashiyama T. Pollen tube guidance by attractant molecules : LUREs. *Cell Struct Funct.* **2010. 35 :** 45-52.

Okuda S, Suzuki T, Kanaoka MM, Mori H, Sasaki N, Higashiyama T. Acquisition of LURE-binding activity at the pollen tube tip of *Torenia fournieri*. *Oxford J Sci Math Mol Plant.* **2013. 6 :** 1074-1090.

O'Neill MA, Warrenfeltz D, Kates K, Pellerin P, Doco T, Darvill AG, Albersheim P. 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.* **1996. 271 :** 22923-22930.

O'Neill MA, Eberhard S, Albersheim P, Darvill AG. Requirement of borate cross-linking of cell wall rhamnogalacturonan II for *Arabidopsis* growth. *Science*. **2001. 294 :** 846-849.

O'Neill MA, Ishii T, Albersheim P, Darvill AG. Rhamnogalacturonan II : structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* **2004**. **55** : 109-139.

Osaka M, Matsuda T, Sakazono S, Masuko-Suzuki H, Maeda S, Sewaki M, Sone M, Takahashi H, Nakazono M, Iwano M, Takayama S, Shimizu KK, Yano K, Lim YP, Suzuki G, Suwabe K, Watanabe M. Cell type-specific transcriptome of *Brassicaceae* stigmatic papilla cells from a combination of laser microdissection and RNA sequencing. *Plant Cell Physiol*. **2013. 54 :** 1894-1906.

Ottmann C, Rose R, Huttenlocher F, Cedzich A, Hauske P, Kaiser M, Huber R, Schaller A. Structural basis for Ca^{2+}-independence and activation by homodimerization of tomato subtilase 3. *PNAS.* **2009**. **106**: 17223-17228.

P.

Pacini E, Franchi GG, Ripaccioli M. Ripe pollen structure and histochemistry of some Gymnosperms. *Plant Syst Evol.* **1999. 217 :** 81-99.

Palanivelu R, Preuss D. Pollen tube targeting and axon guidance : Parallels in tip growth mechanisms. *Trends Cell Biol.* **2000. 10 :** 517-524.

Palanivelu R, Brass L, Edlund AF, Preuss D. Pollen tube growth and guidance is regulated by POP2, an *Arabidopsis* gene that controls GABA levels. *Cell.* **2003. 114 :** 47-59.

Palanivelu R, Preuss D. Distinct short-range ovule signals attract or repel *Arabidopsis thaliana* pollen tubes *in-vitro*. *BMC Plant Biol.* **2006. 6 :** 1-9.

Palin R, Geitmann A. The role of pectin in plant morphogenesis. *Biosystems*. **2012. 109** : 397-402.

Palusa SG, Golovkin M, Shin SB, Richardson DN, Reddy AS. Organ-specific, developmental, hormonal and stress regulation of expression of putative pectate lyase genes in *Arabidopsis*. *New Phytol.* **2007. 174 :** 537-550.

Pang Y, Li L, Ren F, Lu P, Wei P, Cai J, Xin L, Zhang J, Chen J, Wang X. Overexpression of the *tonoplast aquaporin AtTIP5;1* conferred tolerance to boron toxicity in *Arabidopsis*. *J Genet Genom.* **2010. 37 :** 389-397.

Park MH, Suzuki Y, Chono M, Knox JP, Yamaguchi I. *CsAGP1*, a gibberellin-responsive gene from cucumber hypocotyls, encodes a classical arabinogalactan protein and is involved in stem elongation. *Plant Physiol*. **2003. 131 :** 1450-1459.

Parre E, Geitmann A. More than a leak sealant. The mechanical properties of callose in pollen tubes. *Plant Physiol.* **2005a. 137 :** 274-286.

Parre E, Geitmann A. Pectin and the role of the physical properties of the cell wall in pollen tube growth of *Solanum chacoense*. *Planta.* **2005b. 220 :** 582-592.

Paxson-Sowders DM, Owen HA, Makaroff CA. A comparative ultrastructural analysis of exine pattern development in wildtype *Arabidopsis* and a mutant defective in pattern formation. *Protoplasma.* **1997. 198 :** 53-65.

Paynel F, Leroux C, Surcouf O, Schaumann A, Pelloux J, Driouich A, Mollet JC, Lerouge P, Lehner A, Mareck A. Kiwi fruit PMEI inhibits PME activity, modulates root elongation and induces pollen tube burst in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth regul.* **2014. 74 :** 285-297.

Peaucelle A, Louvet R, Johansen JN, Höfte H, Laufs P, Pelloux J, Mouille G. *Arabidopsis* phyllotaxis is controlled by the methyl-esterification status of cell-wall pectins. *Curr Biol*. **2008. 18 :** 1943-1948.

Peaucelle A, Braybrook SA, Le Guillou L, Bron E, Kuhlemeier C, Höfte H. Pectin-induced changes in cell wall mechanics underlie organ initiation in *Arabidopsis*. *Curr Biol*. **2011. 21 :** 1720-1726.

Pellegrini M, Marcotte EM, Thompson MJ, Eisenberg D, Yeates TO. Assigning protein functions by comparative genome analysis : protein phylogenetic profiles. *PNAS.* **1999. 96 :** 4285-4288.

Pelletier S, Van Orden J, Wolf S, Vissenberg K, Delacourt J, Ndong YA, Pelloux J, Bischoff V, Urbain A, Mouille G, Lemonnier G, Renou JP, Höfte H. A role for pectin de-methylesterification in a developmentally regulated growth acceleration in dark-grown Arabidopsis hypocotyls. *New Phytol.* **2010. 188 :** 726-739.

Pelloux J, Rustérucci C, Mellerowicz EJ. New insights into pectin methylesterase structure and function. *Trends Plant Sci.* **2007. 12 :** 267-277.

Pereira AM, Masiero S, Nobre MS, Costa ML, Solís MT, Testillano PS, Sprunck S, Coimbra S. Differential expression patterns of *Arabinogalactan Proteins* in *Arabidopsis thaliana* reproductive tissues. *J Exp Bot*. **2014. 65 :** 5459-5471.

Pereira LG, Coimbra S, Oliveira H, Monteiro L, Sottomayor M. Expression of arabinogalactan protein genes in pollen tubes of *Arabidopsis thaliana*. *Planta.* **2006. 223 :** 374-380.

Pérez S, Rodríguez-Carvajal MA, Doco T. A complex plant cell wall polysaccharide : rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function. *Biochimie.* **2003. 85** : 109-121.

Phillips GO. Molecular association and function of arabinogalactan protein complexes from tree exudates. *Struct Chem*. **2009. 20 :** 309-315.

Pichersky E. Le parfum des Fleurs, entre séduction et répulsion. *Dossier pour la science*. **2012. 77 :** 48-53.

Piffanelli P, Ross JHE, Murphy DJr. Biogenesis and function of the lipidic structures of pollen grains. *Sex Plant Reprod.* **1998. 11 :** 65-80.

Pina C, Pinto F, Feijó JA, Becker JD. Gene family analysis of the *Arabidopsis* pollen transcriptome reveals biological implications for cell growth, division control, and gene expression regulation. *Plant Physiol.* **2005. 138 :** 744-756.

Potocký M, Jones MA, Bezvoda R, Smirnoff N, Žárský V. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase are involved in pollen tube growth. *New Phytol.* **2007. 174 :** 742-751.

Poulter NS, Vatovec S, Franklin-Tong VE. Microtubules are a target for self-incompatibility signaling in *Papaver* pollen. *Plant Physiol*. **2008. 146 :** 1358-1367.

Prado AM, Porterfield DM, Feijo JA. Nitric oxide is involved in growth regulation and re-orientation of pollen tubes. *Development*. **2004. 131 :** 2707-2714.

Prado AM, Colaco R, Moreno N, Silva AC, Feijo JA. Targeting of pollen tubes to ovules is dependent on nitric oxide (NO) signaling. *Mol Plant*. **2008. 1 :** 703-714.

Pressey R, Reger BJ. Polygalacturonase in pollen from corn and other grasses. *Plant Sci.* **1969. 59 :** 57-62.

Puerta AR, Ushijima K, Koba T, Sassa H. Identification and functional analysis of pistil self-incompatibility factor *HT-B* of *Petunia*. *J Exp Bot.* **2009. 60 :** 1309-1318.

Q.

Qi X, Behrens BX, West PR, Mort AJ. Solubilization and partial characterization of extensin fragments from cell walls of cotton suspension cultures. Evidence for a covalent cross-link between extensin and pectin. *Plant Physiol*. **1995. 108 :** 1691-1701.

Qiao H, Wang HY, Zhao L, Zhou JL, Huang J, Zhang YS, Xue Y. The F-box protein *AhSLF-S2* physically interacts with S-RNases that may be inhibited by the ubiquitin/26S proteasome pathway of protein degradation during compatible pollination in Antirrhinum. *Plant Cell.* **2004. 16 :** 582-595.

Qin Y, Chen D, Zhao J. Localization of arabinogalactan proteins in anther, pollen, and pollen tube of *Nicotiana tabacum L*. *Protoplasma*. **2007. 231 :** 43-53.

Qin Y, Leydon AR, Manziello A, Pandey R, Mount D, Denic S, Vasic B, Johnson MA, Palanivenu R. Penetration of the stigma and style elicits a novel transcriptome in pollen tubes, Pointing to genes critical for growth in a pistil. *PLoS Genet.* **2009. 5 :** e1000621.

Quilichini TD, Douglas CJ, Samuels AL. New views of tapetum ultrastructure and pollen exine development in *Arabidopsis*. *Ann. Bot*. **2014. 114 :** 1189-1201.

R.

Raiola A, Camardella L, Giovane A, Mattei B, De Lorenzo G, Cervone F, Bellicampi D. Two *Arabidopsis thaliana* genes encode functional pectin methylesterase inhibitors. *FEBS Lett*. **2004. 557 :** 199-203.

Ralet MC, Crepeau MJ, Lefebvre J, Mouille G, Hofte H, Thibault JF. Reduced number of homogalacturonan domains in pectins of an *Arabidopsis* mutant enhances the flexibility of the polymer. *Biomacromolecules*. **2008. 9 :** 1454-1460.

Ralet MC, Tranquet O, Poulain D, Moïse A, Guillon F. Monoclonal antibodies to rhamnogalacturonan I backbone. *Planta*. **2010. 231 :** 1373-1383.

Ramírez V, López A, Mauch-Mani B, Gil MJ, Vera P. An extracellular subtilase switch for immune priming in *Arabidopsis*. *PLoS Pathogens.* **2013**. **9** : 1003445-1003445.

Rausch T, Greiner S. Plant protein inhibitors of invertases. *Biochim Biophys Acta Prot Proteo.* **2004. 1696 :** 253-261.

Rautengarten C, Steinhauser D, Büssis D, Stintzi A, Schaller A, Kopka J, Altmann T. Inferring hypotheses on functional relationships of genes: analysis of the *Arabidopsis thaliana* subtilase gene family. *PLoS Comput Biol.* **2005. 1 :** 297-312.

Rautengarten C, Usadel B, Neumetzler L, Hartmann J, Büssis D, Altmann T. A subtilisin-like serine protease essential for mucilage release from *Arabidopsis* seed coats. *Plant J.* **2008. 54 :** 466-480.

Rautengarten C, Ebert B, Herter T, Petzold CJ, Ishii T, Mukhopadhyay A, Usadel B, Scheller HV. The interconversion of UDP-arabinopyranose and UDP-arabinofuranose is indispensable for plant development in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **2011. 23 :** 1373-1390.

Ray PM, Green PB, Cleland R. Role of turgor in plant-cell growth. *Nature.* **1972. 239 :** 163-164.

Reiter WD. Biosynthesis and properties of the plant cell wall. *Curr Opin Plant Biol.* **2002. 6 :** 536-542.

Rhee SY, Somerville CR. Tetrad pollen formation in quartet mutants of *Arabidopsis thaliana* is associated with persistence of pectic polysaccharides of the pollen mother cell wall. *Plant J.* **1998. 15 :** 79-88.

Rhee SY, Osborne E, Poindexter PD, Somerville CR. Microspore separation in the quartet 3 mutants of *Arabidopsis* is impaired by a defect in a developmentally regulated polygalacturonase required for pollen mother cell-wall degradation. *Plant Physiol.* **2003. 133 :** 1170-1180.

Richmond TA. Higher plant cellulose synthases. *Gen. Biol.* **2000. 1 :** 1-5.

Richmond TA, Somerville CR. Integrative approaches to determining *Csl* function. *Plant Mol Biol.* **2001. 47 :** 131-143.

Roberts K. How the cell wall acquired a cellular context. *Plant Physiol.* **2001. 125 :** 127-130.

Röckel N, Wolf S, Kost B, Rausch T, Greiner S. Elaborate spatial patterning of cell-wall PME and PMEI at the pollen tube tip involves PMEI endocytosis, and reflets the distribution of esterified and de-esterified pectins. *Plant J.* **2008. 53 :** 133-143.

Rodriguez-Enriquez MJ, Mehdi S, Dickinson HG, Grant-Downton RT. A novel method for efficient *in-vitro* germination and tube growth of *Arabidopsis thaliana* pollen. *New Phytol*. **2013. 197 :** 668-679.

Roggen HPJ, Stanley RG. Cell-wall-hydrolysing enzymes in wall formation as measured by pollen-tube extension. *Planta.* **1969. 84 :** 295-303.

Rose JKC, Braam J, Fry SC, Nishitani K. The XTH family of enzymes involved in xyloglucan endotransglucosylation and endohydrolysis: Current perspectives and a new unifying nomenclature. *Plant Cell Physiol.* **2002. 43 :** 1421-1435.

Rose R, Schaller A, Ottmann C. Structural features of plant subtilases. *Plant Signal Behav.* **2010**. **5** : 180-183.

Rounds CM, Lubeck E, Hepler PK, Winship LJ. Propidium iodide competes with Ca^{2+} to label pectin in pollen tubes and *Arabidopsis* root hairs. *Plant Physiol.* **2011. 157 :** 175-187.

Roy S, Eckard KJ, Lancelle S, Hepler PK, Lord EM. High-pressure freezing improves the ultrastructural preservation of in-vivo grown lily pollen tubes. *Protoplasma*. **1997. 200 :** 87-98.

Roy S, Jauh GY, Hepler PK, Lord EM. Effects of Yariv phenylglycoside on cell wall assembly in the lily pollen tube. *Planta*. **1998. 204 :**450-458.

Rubinstein AL, Márque J, Cervera MS, Bedinger PA. Extensin-like glycoproteins in the maize pollen tube wall. *Plant Cell.* **1995. 7 :** 2211-2225.

S.

Saez-Aguayo S, Ralet MC, Berger A, Botran L, Ropartz D, Marion-Poll A, North HM. *PECTIN METHYLESTERASE INHIBITOR6* promotes *Arabidopsis* mucilage release by limiting methylesterification of homogalacturonan in seed coat epidermal cells. *Plant Cell.* **2013. 25 :** 308-323.

Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method : a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evo*. **1987. 4 :** 406-425.

Sampedro J, Cosgrove DJ. The expansin superfamily. *Gen Biol.* **2005. 6 :** 1-11.

Sampedro J, Pardo B, Gianzo C, Guitian E, Revilla G, Zarra I. Lack of alpha-xylosidase activity in *Arabidopsis* alters xyloglucan composition and results in growth defects. *Plant Physiol*. **2010. 154 :** 1105-1115.

Samuel MA, Chong YT, Haasen KE, Aldea-Brydges MG, Stone SL, Goring DR. Cellular pathways regulating responses to compatible and self-incompatible pollen in *Brassica* and *Arabidopsis* stigmas intersect at *Exo70A1*, a putative component of the exocyst complex. *Plant Cell.* **2009. 21 :** 2655-2671.

Sandhu APS, Randhawa GS, Dhugga KS. Plant cell wall matrix polysaccharide biosynthesis. *Mol Plant*. **2009. 2 :** 840-850.

Sardar HS, Yang J, Showalter AM. Molecular interactions of arabinogalactan proteins with cortical microtubules and F-actin in Bright Yellow-2 tobacco cultured cells. *Plant Physiol.* **2006. 142 :** 1469-1479.

Sassa H, Nishio T, Kowyama Y, Hirano H, Koba T, Ikehashi H. Self-incompatibility (*S*) alleles of the Rosaceae encode members of a distinct class of the T2 *S* ribonuclease superfamily. *Mol Gen Genet.* **1996. 250** : 547-557.

Sassa H, Hirano H. Identification of a new class of pistil-specific proteins of *Petunia inflata* that is structurally similar to, but functionally distinct from, the self-incompatibility factor HT. *Mol Genet Geno.* **2006. 275 :** 97-104.

Schaller A, Stintzi A, Graff L. Subtilases–versatile tools for protein turnover, plant development, and interactions with the environment. *Physiol Plant*. **2012. 145 :** 52-66.

Scheller HV, Jensen JL, Sørensen SO, Harholt J, Geshi N. Biosynthesis of pectin. *Physiol Plant.* **2007. 129 :** 283-295.

Scheller HV, Ulvskov P. Hemicelluloses. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. **2010. 61 :** 263-289.

Schiøtt M, Romanowsky SM, Baekgaard L, Jakobsen MK, Palmgren MG, Harper JF. A plant plasma membrane Ca^{2+} pump is required for normal pollen tube growth and fertilization. *PNAS*. **2004. 101 :** 9502-9507.

Schlüpmann H, Bacic A, Read SM. Uridine diphosphate glucose metabolism and callose synthesis in cultured pollen tubes of *Nicotiana alata* Link et Otto. *Plant Physiol*. **1994. 105 :** 659-670.

Schols HA, Vierhuis E, Bakx EJ, Voragen AG. Different populations of pectic hairy regions occur in apple cell walls. *Carbohyd Res.* **1995. 275 :** 343-360.

Schopfer CR, Nasrallah ME, Nasrallah JB. The male determinant of self-incompatibility in *Brassica*. *Science*. **1999. 286** : 1697-1700.

Schopfer P. Hydroxyl radical-induced cell-wall loosening *in vitro* and *in vivo*: implications for the control of elongation growth. *Plant J.* **2001. 28 :** 679-688.

Schultz CJ, Hauser K, Lind JL, Atkinson AH, Pu ZY, Anderson MA, Clarke AE. Molecular characterisation of a cDNA sequence encoding the backbone of a style-specific 120 kDa glycoprotein which has features of both extensins and arabinogalactan proteins. *Plant Mol Biol.* **1997. 35 :** 833-845.

Schultz CJ, Gilson P, Oxley D, Youl JJ, Bacic A. GPI-anchors on arabinogalactan-proteins: implications for signalling in plants. *Trends Plant Sci.* **1998. 3 :** 426-431.

Schultz CJ, Johnson KL, Currie G, Bacic A. The classical arabinogalactan protein gene family of *Arabidopsis*. *Plant Cell*. **2000. 12 :** 1751-1767.

Schultz CJ, Rumsewicz MP, Johnson KL, Jones BJ, Gaspar YG, Bacic A. Using genomic resources to guide research directions. The arabinogalactan protein gene family as a test case. *Plant Physiol*. **2002. 129 :** 1448-1463.

Scognamiglio M, Ciardiello M, Tamburrini M, Carratore V, Rausch T, Camardella L. The plant invertase inhibitor shares structural properties and disulfide bridges arrangement with the pectin methylesterase inhibitor. *J Prot chem.* **2003. 22 :** 363-369.

Sénéchal F, Graff L, Surcouf O, Marcelo P, Rayon C, Bouton S, Mareck A, Mouille G, Stintzi A, Höfte H, Lerouge P, Schaller A, Pelloux J. *Arabidopsis PECTIN METHYLESTERASE 17* is co-expressed with and processed by *SBT3.5*, a subtilisin-like serine protease. *Ann. Bot.* **2014. 114 :** 1161-1175.

Sharova EI. Expansins: Proteins involved in cell wall softening during plant growth and morphogenesis. *Russ J Plant Physiol.* **2007. 54 :** 713-727.

Sherman-Broyles S, Boggs N, Farkas A, Liu P, Vrebalov J, Nasrallah ME, Nasrallah JB. S locus genes and the evolution of self-fertility in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell.* **2007. 19 :** 94-106.

Sherrier DJ, Prime TA, Dupree P. Glycosylphosphatidylinositol-anchored cell-surface proteins from *Arabidopsis*. *Electrophoresis*. **1999. 20 :** 2027-2035.

Shibuya N, Minami E. Oligosaccharide signalling for defence responses in plant. *Physiol Mol Plant Pathol.* **2001. 59 :** 223-233.

Shin SB, Golovkin M, Reddy AS. A pollen-specific calmodulin-binding protein, NPG1, interacts with putative pectate lyases. *Scientific Reports*. **2014. 4 :** 5263 DOI: 10.1038/srep0526

Showalter AM. Arabinogalactan-proteins : structure, expression and function. *Cell Mol Life Sci.* **2001. 58 :** 1399-1417.

Showalter AM, Keppler B, Lichtenberg J, Gu D, Welch LR. A bioinformatics approach to the identification, classification, and analysis of hydroxyproline-rich glycoproteins. *Plant Physiol.* **2010. 153 :** 485-513.

Sijacic P, Wang X, Skirpan AL, Wang Y, Dowd PE, McCubbin AG, Huang S, Kao T. Identification of the pollen determinant of S-RNase-mediated self-incompatibility. *Nature.* **2004. 429 :** 302-305.

Silipo A, Erbs G, Shinya T, Dow JM, Parrilli M, Lanzetta R, Shibuya N, Newman M, Molinaro A. Glyco-conjugates as elicitors or suppressors of plant innate immunity. *Glycobiology*. **2010. 20 :** 406-419.

Singh MB, Knox RB. Grass pollen allergens: Antigenic relationships detected using monoclonal antibodies and dot blotting immunoassay. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* **1985. 78 :** 300-304.

Sivaguru M, Fujiwara T, Samaj J, Baluska F, Yang Z, Osawa H, Maeda T, Mori T, Volkmann D, Matsumoto H. Aluminum-induced 1-->3-beta-D-glucan inhibits cell-to-cell trafficking of molecules through plasmodesmata. A new mechanism of aluminum toxicity in plants. *Plant Physiol.* **2000. 124 :** 991-1006.

Smalle J, Vierstra RD. The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* **2004. 55 :** 555-590.

Smallwood M, Beven A, Donovan N, Neill SJ, Peart J, Roberts K, Knox JP. Localization of cell wall proteins in relation to the developmental anatomy of the carrot root apex. *Plant J*. **1994. 5 :** 237-246.

Smith LG. Plant cell division: building walls in the right places. *Nature Rev Mol Cell Biol.* **2001. 2:** 33-39.

Snedden WA, Fromm H. Calmodulin, calmodulin-related proteins and plants responses to the environment. *Trends Plant Sci*. **1998. 3 :** 299-304.

Somerville C. Cellulose synthesis in higher plants. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **2006. 22 :** 53-78.

Sommer A, Geist B, Da Ines O, Gehwolf R, Schäffner AR, Obermeyer G. Ectopic expression of *Arabidopsis thaliana* plasma membrane intrinsic protein 2 aquaporins in *lily* pollen increases the plasma membrane water permeability of grain but not of tube protoplasts. *New Phytol*. **2008. 180 :** 787-797.

Sommer-Knudsen J, Clarke AE, Bacic A. Proline- and hydroxyproline-rich gene products in the sexual tissues of flowers. *Sex Plant Reprod.* **1997. 10 :** 253-260.

Sørensen I, Pettolino FA, Wilson SM, Doblin MS, Johansen B, Bacic A, Willats WGT. Mixed-linkage (1-->3),(1-->4)-beta-D-glucan is not unique to the Poales and is an abundant component of Equisetum arvense cell walls. *Plant J.* **2008. 54 :** 510-521.

Soto G, Alleva K, Mazzella MA, Amodeo G, Muschietti JP. *AtTIP1; 3* and AtTIP5;1, the only highly expressed *Arabidopsis* pollen-specific aquaporins, transport water and urea*. FEBS Lett*. **2008. 582 :** 4077-4082.

Speranza A, Crinelli R, Scoccianti V, Geitmann A. Reactive oxygen species are involved in pollen tube initiation in kiwifruit. *Plant Biol*. **2012. 14 :** 64-76.

Srivastava R, Liu JX, Howell SH. Proteolytic processing of a precursor protein for a growth-promoting peptide by a subtilisin serine protease in *Arabidopsis*. *Plant J.* **2008**. **56 :** 219-227.

Staehelin AL, Moore I. The plant Golgi apparatus : Structure, Functional Organization and Trafficking Mechanisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. **1995. 46 :** 261-288.

Steinbachs JE, Holsinger KE. S-RNase-mediated gametophytic self-incompatibility is ancestral in eudicots. *Mol Biol Evol.* **2002. 19 :** 825-829.

Steinhorst L, Kudla J. Calcium-a central regulator of pollen germination and tube growth. *Biochim Biophys Acta*. **2013. 1833 :** 1573-1581.

Sterling JD, Atmodjo MA, Inwood SE, Kolli VK, Quigley HF, Hahn MG, Mohnen D. Functional identification of an *Arabidopsis* pectin biosynthetic homogalacturonan galacturonosyltransferase*. PNAS.* **2006. 103 :** 5236-5241.

Stone SL, Anderson EM, Mullen RT, Goring DR. ARC1 Is an E3 Ubiquitin Ligase and Promotes the Ubiquitination of Proteins during the Rejection of Self-Incompatible *Brassica* Pollen. *Plant Cell*. **2003. 15 :** 885-898.

Stratford S, Barnes W, Hohorst DL, Sagert JG, Cotter R, Golubiewski A, Showalter AM, McCormick S, Bedinger P. A leucine-rich repeat region is conserved in pollen extensin-like (*Pex*) proteins in monocots and dicots. *Plant Mol Biol.* **2001. 46 :** 43-56.

Sun L, Van Nocker S. Analysis of promoter activity of members of the *PECTATE LYASE-LIKE* (*PLL*) gene family in cell separation in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol.* **2010. 10 :** 152.

Sun WX, Kieliszewski MJ, Showalter AM. Overexpression of tomato *Le*AGP-1 arabinogalactan-protein promotes lateral branching and hampers reproductive development. *Plant J.* **2004a. 40 :** 870-881.

Sun WX, Zhao ZD, Hare MC, Kieliszewski MJ, Showalter AM. Tomato *Le*AGP-1 is a plasma membrane-bound, glycosylphosphatidylinositol-anchored arabinogalactan-protein. *Physiol Plant.* **2004b. 120 :** 319-327.

Svetek J, Yadav MP, Nothnagel EA. Presence of a glycosylphosphatidylinositol lipid anchor on rose arabinogalactan proteins*. J Biol Chem*. **1999. 274 :** 14724-14733.

Sze H, Frietsch S, Li X, Bock KW, Harper JF. The pollen tube; genomic and molecular analyses of transporters in the male gametophyte. *Plant Cell Monogr.* **2006. 3:** 71-93.

T.

Takasaki T, Hatakeyama K, Suzuki G, Watanabe M, Isogai A, Hinata K. The S receptor kinase determines self-incompatibility in *Brassica* stigma. *Nature.* **2000. 403 :** 913-916.

Takayama S, Shiba H, Iwano M, Shimosato H, Che FS, Kai N, Watanabe M, Suzuki G, Hinata K, Isogai A. The pollen determinant of self-incompatibility in *Brassica campestris*. *PNAS.* **2000. 97 :** 1920-1925.

Takayama S, Isogai A. Self-incompatibility in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* **2005. 56 :** 467-489.

Takeda H, Yoshikawa T, Liu XZ, Nakagawa N, Li YQ, Sakurai N. Molecular cloning of two exo-beta-glucanases and their *in-vivo* substrates in the cell walls of *lily* pollen tubes. *Plant Cell Physiol.* **2004. 45 :** 436-444.

Takeda S, Paszkowski J. DNA methylation and epigenetic inheritance during plant gametogenesis. *Chromosoma*. **2006. 115 :** 27-35.

Takos AM, Dry LB, Soole KL. Glycosyl-phosphatidylinositol-anchor addition signals are processed in *Nicotiana tabacum. Plant J.* **2000. 21 :** 43-52.

Tamari F, Shore JS. Allelic variation for a short-specific polygalacturonase in *Turnera subulata*: Is it associated with the degree of self-compatibility? *Int J Plant Sci.* **2006. 167 :** 125-133.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (*MEGA*) software version 4.0. *Mol Biol Evol.* **2007. 24 :** 1596-1599.

Tanthanuch W, Chantarangsee M, Maneesan J, Ketudat-Cairns J. Genomic and expression analysis of glycosyl hydrolase family 35 genes from rice (*Oryza sativa L.*). *BMC Plant Biol.* **2008. 8 :** 1-17.

Taylor LP, Hepler PK. Pollen germination and tube growth. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* **1997. 48 :** 461-491.

Tenhaken R. Cell wall remodeling under abiotic stress. *Front Plant Sci.* **2015. 5.**

Testerink C, Munnik T. Molecular, cellular, and physiological responses to phosphatidic acid formation in plants. *J Exp Bot*. **2011. 62 :** 2349-2361.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W : improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **1994. 22 :** 4673-4680.

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

Thonar C, Liners F, Van Cutsem P. Polymorphism and modulation of cell wall esterase enzyme activities in the chicory root during the growing season. *J Exp Bot*. **2006. 57 :** 81-89.

Tian GW, Chen MH, Zaltsman A, citovsky V. Pollen-specific pectin methylesterase involved in pollen tube growth. *Dev Biol.* **2006. 294 :** 83-91.

Tourte Y, Bordonneau M, Henry M, Tourte C. Le monde des végétaux Organisation, physiologie et génomique. *Ed. DUNOD*. Paris. **2005.**

Tripathi LP, Sowdhamini R. Cross genome comparisons of serine proteases in *Arabidopsis* and rice. *BMC Genomics*. **2006. 7 :** 1-31.

Tsuchimatsu T, Suwabe K, Shimizu-Inatsugi R, Isokawa S, Pavidis P, Stadler T, Suzuki G, Takayama S, Watanabe M, Shimizu KK. Evolution of self-compatibility in *Arabidopsis* by a mutation in the male specificity gene. *Nature*. **2010. 464 :** 1342-1346.

Tung CW, Dwyer KG, Nasrallah ME, Nasrallah JB. Genome-wide identification of genes expressed in *Arabidopsis* pistils specifically along the path of pollen tube growth. *Plant Physiol.* **2005. 138 :** 977-989.

Twell D, Park SK, Lalanne E. Asymmetric division and cell-fate determination in developing pollen. *Trends Plant Sci*. **1998. 3 :** 305-310.

Twell D. A blossoming romance : gamete interactions in flowering plants. *Nature Cell Biol.* **2006. 8 :** 14-16.

Twell D. Male gametogenesis and germline specification in flowering plants. *Sex Plant Reprod*. **2011. 24:** 149-160.

U.

Ueki S, Citovsky V. The systemic movement of a tobamovirus is inhibited by a cadmium-ion-induced glycine-rich protein. *Nature Cell Biol.* **2002. 4 :** 478-486.

V.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Gen Biol.* **2002**. **3** : 1-12.

Velasquez SM, Ricardi MM, Dorosz JG, Fernandez PV, Nadra AD, Pol-Fachin L, Egelund J, Gille S, Harholt J, Ciancia M, Verli H, Pauly M, Bacic A, Olsen CE, Ulvskov P, Petersen BL, Somerville C, Iusem ND, Estevez JM. O-glycosylated cell wall proteins are essential in root hair growth. *Science.* **2011. 332 :** 1401-1403.

Verhertbruggen Y, Marcus SE, Haeger A, Ordaz-Ortiz JJ, Knox JP. An extended set of monoclonal antibodies to pectic homogalacturonan. *Carbohyd Res.* **2009. 344 :** 1858-1862.

Verma DP, Hong Z. Plant callose synthase complexes. *Plant Mol Biol.* **2001. 47 :** 693-701.

Vicré M, Santaella C, Blanchet S, Gateau A, Driouich A. Root border-like cells of *Arabidopsis*. Microscopical characterization and role in the interaction with rhizobacteria. *Plant Physiol.* **2005. 138 :** 998-1008.

Vidal S, Williams P, O'Neill MA, Pellerin P. Polysaccharides from grape berry cell walls. Part I : tissue distribution and structural characterization of the pectic polysaccharides. *Carbohyd Polym.* **2001. 45 :** 315-323.

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

Vizcay-Barrena G, Wilson ZA. Altered tapetal PCD and pollen wall development in the *Arabidopsis ms1* mutant. *J Exp Bot*. **2006. 57 :** 2709-2717.

Vogler H, Draeger C, Weber A, Felekis D, Eichenberger C, Routier-Kierzkowska AL, Boisson-Dernier A, Ringli C, Nelson BJ, Smith RS, Grossniklaus U. The pollen tube: a soft shell with a hard core. *Plant J*. **2013. 73 :** 617-627.

Von Groll U, Berger D, Altmann T. The subtilisin-like serine protease SDD1 mediates cell-to-cell signaling during *Arabidopsis* stomatal development. *Plant Cell.* **2002. 14:** 1527-1539.

Voxeur A, Gilbert L, Rihouey C, Driouich A, Rothan C, Baldet P, Lerouge P. 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*. **2011. 286 :** 8014-8020.

Voxeur A, André A, Breton C, Lerouge P. Identification of putative rhamnogalacturonan-II specific glycosyltransferases in *Arabidopsis* using a combination of bioinformatics approaches. *PloS ONE.* **2012**. **7 :** e51129.

W.

Walker M, Tehseen M, Doblin MS, Pettolino FA, Wilson SM, Bacic A, Golz JF. The transcriptional regulator *LEUNIG_HOMOLOG* regulates mucilage release from the *Arabidopsis testa*. *Plant Physiol.* **2011. 156 :** 46-60.

Wang HJ, Huang JC, Jauh GY. Pollen germination and tube growth. *Adv. Bot. Res.* **2010. 54 :** 1-52.

Wang L, Wang W, Wang YQ, Liu YY, Wang JX, Zhang XQ, Ye D, Chen LQ. *Arabidopsis* Galacturonosyltransferase (*GAUT*) *13* and *GAUT14* have redundant functions in pollen tube growth. *Mol. Plant*. **2013. 6 :** 1131-1148.

Wang SS, Diao WZ, Yang X, Qiao Z, Wang M, Achaya BR, Zhang W. *Arabidopsis thaliana* CML25 mediates the Ca^{2+} regulation of K^+ transmembrane trafficking during pollen germination and tube elongation. *Plant Cell Environ*. **2015.** doi : 10.1111/pce.12559.

Wang W, Wang L, Chen C, Xiong G, Tan XY, Yang, KZ, Wang ZC, Zhou Y, Ye D, Chen LQ. *Arabidopsis CSLD1* and *CSLD4* are required for cellulose deposition and normal growth of pollen tubes. *J Exp Bot*. **2011. 62 :** 5161-5177.

Wei G, Shirsat AH. Extensin over-expression in *Arabidopsis* limits pathogen invasinveness. *Mol Plant Pathol*. **2006. 7 :** 579-592.

Western TL, Burn J, Tan WL, Skinner DJ, Martin-McCaffrey L, Moffatt BA, Haughn GW. Isolation and characterization of mutants defective in seed coat mucilage secretory cell development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **2001. 127 :** 998-1011.

Whitcombe AJ, O'Neill MA, Steffan W, Albersheim P, Darvill AG. Structural characterization of the pectic polysaccharide, rhamnogalacturonan-II. *Carbohyd Res.* **1995. 271 :** 15-29.

Willats WG, Knox JP. A role for arabinogalactan-proteins in plant cell expansion : evidence from studies on the interaction of beta-glucosyl Yariv reagent with seedlings of *Arabidopsis thaliana. Plant J.* **1996. 9 :** 919-925.

Willats WG, Marcus SE, Knox JP. Generation of a monoclonal antibody specific to (1→5)-α-L-arabinan. *Carbohyd Res*. **1998. 308 :** 149-152.

Willats WG, Orfila C, Limberg G, Buchholt HC, Van Alebeek GJ, Voragen AG, Marcus SE, Christensen TM, Mikkelsen JD, Murray BS. Modulation of the degree and pattern of methyl-esterification of pectic homogalacturonan in plant cell walls. Implications for pectin methyl esterase action, matrix properties, and cell adhesion. *J Biol Chem.* **2001. 276 :** 19404-19413.

Willats WG, McCartney L, Steele-King CG, Marcus SE, Mort A, Huisman M, Van Alebeek GJ, Schols HA, Voragen AGJ, Le Goff A, Bonnin E, Thibault JF, Knox JP. A xylogalacturonan epitope is specifically associated with plant cell detachment. *Planta*. **2004. 218** : 673-681.

Williams JS, Natale CA, Wang N, Brubaker TR, Sun P, Kao TH. Four previously identified *Petunia inflata S-locus F-box* genes are involved in pollen specificity in self-incompatibility. *Mol Plant.* **2014. 7 :** 567-569.

Wilson LG, Fry JC. Extensin-a major cell wall glycoprotein. *Plant Cell Environ*. **1986. 4 :** 239-260.

Wing RA, Yamaguchi J, Larabell SK, Ursin VM, McCormick S. Molecular and genetic characterization of two pollen-expressed genes that have sequence similarity to pectate lyases of the plant pathogen *Erwinia*. *Plant Mol Biol.* **1989. 14 :** 17-28.

Winship LJ, Obermeyer G, Geitmann A, Hepler PK. Pollen tubes and the physical world. *Trends Plant Sci.* **2011. 16 :** 353-355.

Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson GV, Provart NJ. An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PloS ONE*. **2007. 2 :** e718.

Wolf S, Grsic-Rausch S, Rausch T, Greiner S. Identification of pollen-expressed pectin methylesterase inhibitors in *Arabidopsis*. *FEBS Lett.* **2003. 555 :** 551-555.

Wolf S, Mouille G, Pelloux J. Homogalacturonan methyl-esterification and plant development. *Mol Plant.* **2009a. 2 :** 851-560.

Wolf S, Rausch T, Greiner S. The N-terminal pro region mediates retention of unprocessed type-I PME in the Golgi apparatus. *Plant J.* **2009b. 58 :** 361-375.

Wolf S, Hématy K, Höfte H. Growth Control and Cell Wall Signaling in Plants. *Annu Rev Plant Biol.* **2012a. 63 :** 381-407.

Wolf S, Mravec J, Greiner S, Mouille G, Höfte H. Plant Cell Wall homeostasis is mediated by Brassinosteroid Feedback Signaling. *Curr Biol.* **2012b. 22 :** 1732-1737.

Wolf S, Höfte H. Growth control: a saga of cell walls, ROS, and peptide receptors. *Plant Cell*. **2014. 26 :** 1848-1856.

Woriedh M, Wolf S, Márton ML. External application of gametophyte-specific *Zm*PMEI1 induces pollen tube burst in maize. *Plant Reprod.* **2013. 26 :** 255-266.

Wu AM, Rihouey C, Seveno M, Hörnblad E, Singh S, Matsunaga T, Ishii T, Lerouge P, Marchant A. The *Arabidopsis IRX10* and *IRX10-LIKE* glycosyltransferases are critical for glucuronoxylan biosynthesis during secondary cell wall formation. *Plant J.* **2009. 57 :** 718-731.

Wu HM, Wang H, Cheung AY. A pollen tube growth stimulatory glycoprotein is deglycosylated by pollen tubes and displays a glycosylation gradient in the flower. *Cell.* **1995. 82 :** 395-403.

Wudick MM, Luu DT, Maurel C. A look inside: localization patterns and functions of intracellular plant aquaporins. *New Phytol.* **2009. 184 :** 289-302.

Wudick MM, Luu DT, Tournaire-Roux C, Sakamoto W, Maurel C. Vegetative and sperm cell-specific aquaporins of *Arabidopsis* highlight the vacuolar equipment of pollen and contribute to plant reproduction. *Plant Physiol*. **2014. 164 :** 1697-1706.

X.

Xie B, Wang X, Zhu M, Zhang Z, Hong Z. *CalS7* encodes a callose synthase responsible for callose deposition in the phloem. *Plant J.* **2011. 65 :** 1-14.

Xue YB, Carpenter R, Dickinson HG, Coen ES. Origin of allelic diversity in *Antirrhinum S* locus RNases. *Plant Cell.* **1996. 8 :** 805-814.

Y.

Yadegari R, Drews GN. Female gametophyte development. *Plant Cell.* **2004. 16 :** S133-S141.

Yamamoto M, Tantikanjana T, Nishio T, Nasrallah ME, Nasrallah JB. Site-specific N-glycosylation of the S-Locus receptor kinase and its role in the self-incompatibility response of the *Brassicaceae*. *Plant Cell.* **2014.** pii : tpc.114.131987.

Yang C, Vizcay-Barrena G, Conner K, Wilson ZA. *MALES STERILITY 1* is required for tapetal developmental and pollen wall biosynthesis. *Plant Cell.* **2007. 19 :** 3530-3548.

Yang J, Zhang Y, Liang Y, Showalter AM. Expression analyses of *AtAGP17* and *AtAGP19*, two lysine-rich arabinogalactan proteins, in *Arabidopsis*. *Plant Biol*. **2011. 13:** 431-438.

Yariv J, Rapport MM, Graf L. The interaction of glycosides and saccharides with antibody to the corresponding phenylazo glycosides. *Biochem J*. **1962. 85 :** 383-388.

Yariv J, Lis E, Katchalski E. Precipitation of arabic acid and some seed polysaccharides by glycosylphenylazo dyes. *Biochem J.* **1967. 105 :** 1-2.

Yokoyama R, Nishitani K. A comprehensive expression analysis of all members of a gene family encoding cell-wall enzymes allowed us to predict *cis*-regulatory regions involved in cell wall construction in specific organs of *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* **2001. 42 :** 1025-1033.

Yokoyama R, Rose JKC Nishitani K. A surprising diversity and abundance of xyloglucan endotransglucosylase/hydrolases in rice. Classification and expression analysis. *Plant Physiol*. **2004. 134 :** 1088-1099.

Yoon GM, Dowd PE, Gilroy S, McCubbin AG. Calcium-dependent protein kinase isoforms in Petunia have distinct functions in pollen tube growth, including regulating polarity. *Plant Cell*. **2006. 18 :** 867-878.

Yu GH, Liang JG, He ZK, Sun MX. Quantum dot-mediated detection of gamma-aminobutyric acid binding sites on the surface of living pollen protoplasts in tobacco. *Chem Biol.* **2006. 13 :** 723-731.

Yu GH, Zou J, Feng J, Peng XB, Wu JY, Wu YL, Palanivelu R, Sun MX. Exogenous γ-aminobutyric acid affects pollen tube growth *via* modulating putative Ca^{2+}-permeable membrane channels and is coupled to negative regulation on glutamate decarboxylase. *J Exp Bot*. **2014. 65:** 3235-3248.

Z.

Zablackis E, Huang J, Müller B, Darvill AG, Albersheim P. Characterization of the cell-wall polysaccharides of *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant Physiol.* **1995. 107 :** 1129-1138.

Zaidi MA, O'Leary S, Wu S, Gleddie SC, Eudes F, Laroche A, Robert LS. A molecular and proteomic investigation of proteins rapidly released from triticale pollen upon hydration. *Plant Mol Biol.* **2012. 79 :** 101-121.

Zandleven J, Sørensen SO, Harholt J, Beldman G, Schols HA, Scheller HV, Voragen AJ. Xylogalacturonan exists in cell walls from various tissues of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry.* **2007. 68 :** 1219-1226.

Zavaliev R, Ueki S, Epel BL, Citovsky V. Biology of callose (β-1,3-glucan) turnover at plasmodesmata. *Protoplasma.* **2011. 248 :** 117-130.

Zerzour R, Kroeger JH, Geitmann A. Polar growth in pollen tubes is associated with spatially confined dynamic changes in cell mechanical properties. *Dev Biol*. **2009. 334 :** 437-446.

Zhang GF, Staehelin LA. Functional compartmentation of the Golgi apparatus of plant cells: Immunocytochemical analysis of high-pressure frozen- and freeze-substituted sycamore maple suspension culture cells. *Plant Physiol.* **1992. 99 :** 1070-1083.

Zhang GY, Feng J, Wu J and Whang XW. *BoPMEI1*, a pollen-specific pectin methylesterase inhibitor, has an essential role in pollen tube growth. *Planta.* **2010. 231 :** 1323-1334.

Zhang X, Henriques R, Lin SS, Niu QW, Chua NH. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nature Prot*. **2006. 1** : 641-647.

Zhang X, Ma H, Qi H, Zhao J. Roles of hydroxyproline-rich glycoproteins in the pollen tube and style cell growth of tobacco (*Nicotiana tabacum L.*). *Plant Physiol.* **2014. 171 :** 1036-1045.

Zhang Y, Zhao Z, Xue Y. Roles of proteolysis in plant selfincompatibility. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* **2009. 60 :** 21-42.

Zhang YZ, Yang J, Showalter AM. *At*AGP18 is localized at the plasma membrane and functions in plant growth and development. *Planta*. **2011. 233 :** 675-683.

Zhang Z, Zhu J, Gao J, Wang C, Li H, Li H, Zhang H, Zhang S, Wang D, Wang Q, Huang H, Xia H, Yang Z. Transcription factor *AtMYB103* is required for anther development by regulating tapetum development, callose dissolution and exine formation in *Arabidopsis. Plant J.* **2007. 52** : 528-538.

Zhao J, Yang HY, Lord EM. Calcium levels increase in the lily stylar transmitting tract after pollination. *Sex Plant Reprod.* **2004. 16 :** 259-263.

Zhao C, Craig JC, Petzold HE, Dickerman AW, Beers EP. The xylem and phloem transcriptomes from secondary tissues of the *Arabidopsis* root-hypocotyl. *Plant Physiol.* **2005. 138 :** 803-818.

Zhou JL, Wang F, Ma WS, Zhang YS, Han B, Xue YB. Structural and transcriptional analysis of *S*-locus F-box genes in *Antirrhinum*. *Sex Plant Reprod.* **2003. 16 :** 165-177.

Zhu Y, Zhao P, Wu X, Wang W, Scali M, Cresi M. Proteomic identification of differentially expressed proteins in mature and germinated maize pollen. *Acta Physiol Planta.* **2011. 33 :** 1467-1474.

Zinkl GM, Zwiebel BI, Grier DG, Preuss D. Pollen-stigma adhesion in *Arabidopsis*: a species-specific interaction mediated by lipophilic molecules in the pollen exine. *Development*. **1999. 126 :** 5431-5440.

Zonia L, Munnik T. Vesicle trafficking dynamics and visualization of zones of exocytosis and endocytosis in tobacco pollen tubes. *J Exp Bot.* **2008. 59 :** 861-873.

Zonia L. Spatial and temporal integration of signalling networks regulating pollen tube growth. *J Exp Bot.* **2010. 61 :** 1939-1957.

Zonia L, Munnik T. Understanding pollen tube growth: the hydrodynamic model versus the cell wall model. *Trends Plant Sci*. **2011. 16 :** 347-352.

Zuo J, Niu QW, Nishizawa N, Wu Y, Kost B, Chua NH. *KORRIGAN*, an *Arabidopsis* endo-1,4-beta-glucanase, localizes to the cell plate by polarized targeting and is essential for cytokinesis. *Plant Cell.* **2000. 12 :** 1137-1152.

Annexe 1

a. Alignement des séquences d'ADN de *PME48* et *PPME1* :

Figure 69 : Alignements *via* ClustalW2 des séquences d'ADNc de At1g69940 et At5g07410, codant respectivement pour la PME48 et la PPME1 (A), et des séquences non traduites 3'UTR et 5'UTR (respectivement présentés en B et C).

b. Alignement des séquences protéiques de PME48 et PPME1 avec la PME d'orange :

Ces alignements ont été réalisés avec l'aide du logiciel : CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment.

Alignement de PPME1 et de la PME orange :

```
PPME1           ------IINVNPKGGEFKTLTDAIKSVPAGNTKRVIIKMAPGEYKEKVTIDRNKPFITLM 54
PMEOR           SSVTPNVVVAADGSGNFKTVAASVAAAPQGGTKRYIIRIKAGVYRENVEVTKKHKNIMFI 60
                      :: .   .*:***:: :: :.* *.*** **:: .* *:*:* : :::  * ::

PPME1           GQPNAMPVITYDG-TAAKYGTVDSASLIILSDYFMAVNIVVKNTAPAPDGKTKGAQALSM 113
PMEOR           GDGRTRTIITGSRNVVDGSTTFKSATVAVVGEGFLARDITFQNTAGPSK-----HQAVAL 115
                *: .: .:** .  ..    *..**:: ::.: *:* :*..:*** ...      **:::

PPME1           RISGNFAAFYNCKFYGFQDTICDDTGNHFFKDCYVEGTFDFIFGSGTSMYLGTQLHVVGD 173
PMEOR           RVGADLSAFYNCDMLAYQDTLYVHSNRQFFVNCLIAGTVDFIFGNAAAVLQNCDIHARKP 175
                *:..:::*****.: .:***:  .:..:** :* : **.*****..:::  . ::*.

PPME1           G---IRVIAAHAGKSAEEKSGYSFVHCKVTGTGGG--------IYLGRAWMSHPKVVYAY 222
PMEOR           NSGQKNMVTAQGRADPNQNTGIVIQKSRIGATSDLKPVQGSFPTYLGRPWKEYSRTVIMQ 235
                .    .:::*:.  ..:::::*  : :.:: .*..          ****.* .:.:.*

PPME1           TEMTSVVNPTGWQENKTPAHDKTVFYGEYKCSGPGS---HKAKRVPFTQDIDDKEANRFL 279
PMEOR           SSITDVIHPAGWHEWDGNFALNTLFYGEHQNAGAGAGTSGRVKWKGFRVITSATEAQAFT 295
                :.:*.*::*:**:* .     :*:****:: :*.*:    :.*   *    . .**: *

PPME1           SLGYIQG--------------- 286
PMEOR           PGSFIAGSSWLGSTGFPFSLSL 317
                . .:* *
```

Alignement PME48 et de la PME orange :

```
PME48           ------IINVNPKGGEFKTLTDAIKSVPAGNTKRVIIKMAHGEYREKVTIDRNKPFITLM 54
PMEOR           SSVTPNVVVAADGSGNFKTVAASVAAAPQGGTKRYIIRIKAGVYRENVEVTKKHKNIMFI 60
                      :: .   .*:***:: :: :.* *.*** **::  * ***:* : :::  * ::

PME48           GQPNAMPVITYDG-TAAKYGTVDSASLIILSDYFMAVNIVVKNTAPAPDGKTKGAQALSM 113
PMEOR           GDGRTRTIITGSRNVVDGSTTFKSATVAVVGEGFLARDITFQNTAGPSK-----HQAVAL 115
                *: .: .:** .  ..    *..**:: ::.: *:* :*..:*** ...      **:::

PME48           RISGNFAAFYNCKFYGFQDTICDDTGNHFFKDCYVEGTFDFIFGSGTSMYLGTQLHVVGD 173
PMEOR           RVGADLSAFYNCDMLAYQDTLYVHSNRQFFVNCLIAGTVDFIFGNAAAVLQNCDIHARKP 175
                *:..:::*****.: .:***:  .:..:** :* : **.*****..:::  . ::*.

PME48           G---IRVIAAHAGKSAEEKSGYSFVHCKVTGTGGG--------IYLGRAWMSHPKVVYAY 222
PMEOR           NSGQKNMVTAQGRADPNQNTGIVIQKSRIGATSDLKPVQGSFPTYLGRPWKEYSRTVIMQ 235
                .    .:::*:.  ..:::::*  : :.:: .*..          ****.* .:.:.*

PME48           TEMTSVVNPTGWQENKTPAHDKTVFYGEYKCSGPGS---HKAKRVPFTQDIDDKEANCFL 279
PMEOR           SSITDVIHPAGWHEWDGNFALNTLFYGEHQNAGAGAGTSGRVKWKGFRVITSATEAQAFT 295
                :.:*.*::*:**:* .     :*:****:: :*.*:    :.*   *    . .**:.*

PME48           SLGYIQG--------------- 286
PMEOR           PGSFIAGSSWLGSTGFPFSLSL 317
                . .:* *
```

Annexe 2

Enzymes de restrictions utilisées dans cette étude :

*BamH*I possède deux sites de restrictions aux positions 5227 et 5984 pb (libération de *SV40-sYFP* ~800 pb).

*Hind*III possède deux sites de restrictions aux positions 4282 et 4615 pb (~333 premières pb de *PRO::PME48*).

*Sac*I possède deux sites de restrictions aux positions 4464 et 6265 pb (~1800 pb: 743 pb de *PRO::PME48* + *SV40-sYFP* + Nos t).

*Xba*I possède un site de restriction à la position 6240 pb.

Amorces utilisées dans cette étude :

M13 for (GTTTTCCCAGTCAC) à la position 4176 pb.

Rev3PPE50 (CAGTAGGAGTAGGAGGGAGT) à la position 4792 pb.

Taille de l'amplification de ~ 600 pb.

For1PPE50 (GGATGGAAAAATGGATCACC) à la position 5154 pb.

M13-22 (GTAAAACGACGGCCAGT) à la position 4196 pb.

Taille de l'amplification de ~ 1,1 kb.

Annexe 3

Analyses moléculaires de l'insertion de l'ADN-T dans les mutants :

Les cartes génomiques des mutants utilisés lors de cette étude sont présentées dans cette partie, avec les séquences d'ADNg des gènes d'intérêts, la position de l'insertion d'ADN-T des mutants analysés, ainsi que la position d'hybridation des différents couples d'amorces (c.f. II. 3. d. Sélection des lignées homozygotes mutantes : Tableau 5).

Toutes les séquences données ont été présentées de la région 5' vers la 3', la taille de l'amplification par PCR pour la sélection des lignées homozygotes est également donnée. Gris ou souligné : séquence flanquant de l'insert (*matching flanking*), Vert : *left border insert*, Rouge : *right border insert*, ATG : codon start / stop et jaune/bleu/vert : amorces spécifiques du gène d'intérêt. bases : Région non codante (UTR en 5' et 3') ; BASES : EXON ; bases : INTRON.

Le mutant *ppme1* :

Séquence d'ADN génomique de *PPME1* :

La PPME1 est codée par le gène At1g69940 (d'une taille totale de 1690 pb). La lignée SALK_077776 possède une insertion d'ADN-T, qui est représentée dans la séquence ci-dessous.

tcatccagaaaaaaaaaacgaaaaaaaacaaaaaaaaataataaaacaaaaaaaacttttttatttttaaataaaaataaaataaaaaATGGGATACACAAATGTGTCCATTTTATTAGGCCTGTTGATGGTCTTTGTTACACCGATGGTGTTCGCAGATGATGTGACACCAATCCCAGAGGGCAAACCCCAAGTGGCGCAGTGGTTCAATGCCAACGTTGGTCCATTGGCTCAACGTAAAGGCTTAGATCCTGCTCTTGTAGCTGCTGAGGCTGCTCCACGTATCATCAACgtactattcacacttattgtcttaaactcatcctttgtaccaatagatttttgatacaatttttttgaaaaacatgtaaaaattattgcagGTGAATCCAAAGGGTGGTGAATTCAAAACACTAACGGACGCAATAAAGAGCGTTCCTGCAGGGAACACAAAGCGGGTGATCATAAAGATGGCTCCTGGTGAATACAAAGAGAAGGTCACTATCGACAGGAACAAACCCTTCATTACATTGATGGGACAACCCAATGCCATGCCTGTTATCACCTATGACGGTACCGCCGCCAAGTATGGAACCGTTGATAGCGCCTCTCTCATTATCTTATCCGACTATTTCATGGCCGTTAACATCGTCGTTAAGgtaagtgatcctactatatatcatacatctatgtgactagtcgactatttcatggccgagtgatttatttttttgcatatgtagAACACTGCGCCGGCACCAGATGGTAAAACTAAGGGAGCACAAGCTTTATCCATGAGAATCTCCGGAAATTTTGCTGCTTTCTACAACTGCAAATTCTACGGTTTCCAAGACACAATCTGTGACGATACAGGAAACCATTTCTT

CAAGGATTGTTACGTTGAAGGAACATTCGATTTCATCTTCGGAAGTGGAACCTCTATGTACTTGgtac
gtaacatctcatacttatttcttaatacataaagtgcgagatctctaatgcatgtttgagttcaaaag
GGAACACAATTGCACGTGGTTGGAGACGGTATTAGAGTGATAGCAGCGCATGCAGGAAAGAGCGCAGA
AGAGAAGAGTGGATACTCTTTCGTGCACTGCAAGGTGACTGGAACCGGTGGAGGAATTTATTTGGGAA
GAGCATGGATGAGCCACCCTAAGGTTGTTTATGCCTACACCGAGATGACCAGCGTTGTCAACCCCACC
GGATGGCAAGAAAACAAGACTCCCGCACATGACAAgtaagtcccacttttcacattacataaaaaatc
gtatgaatatcacccaatcggtccatgtcctttatgctgattatatcaaaaatgacagAACCGTGTTC
TACGGAGAGTACAAGTGTTCAGGACCAGGATCACACAAAGCCAAGAGAGTACCATTCACACAAGACAT
TGACGACAAAGAAGCTAACCGTTTCCTATCCCTCGGCTACATCCAAGGATCCAAGTGGCTTCTCCCAC
CACCCGCTTTGTAAactcttcaatatcaagtctaaaatcatattttgcacatatatcacttttaacaa
aaaaattatttttacatatatcacttttagcaaacttttctttacctagtcgtcactacttacgacc
ctatgtatgcttttatgcaaagaaccgagaggtcgataatctgagaaacatataagca

***ppme1* :**

Couple d'amorce du gène *WT* :

PPME1_FP	GTCCATTTTATTAGGCCTGTTG	(Tm 59,83°C ; 65,00% GC)
PPME1_RP	GCGGTACCGTCATAGGTGAT	(Tm 59,84°C ; 64,00% GC)

Taille attendue 474 pb pour de l'ADNg WT et 384 pb pour de l'ADNc WT

Couple d'amorce du gène avec l'insert d'ADN-T (*ppme1*) :

Amorce For	LBb1.3	(Tm 60.00°C ; 64,00% GC)
PPME1_RP	GCGGTACCGTCATAGGTGAT	(Tm 59,84°C ; 64,00% GC)

Taille attendue 669 pb pour de l'ADNg avec insert d'ADN-T

Pour la sélection du mutant *ppme1* : La présence de l'insert a été vérifiée par PCR avec les couples d'amorces PPME1_FP/PPME1_RP et LBb1.3/PPME1_RP. La taille attendue de l'amplification est de 474 paires de bases (pb) avec de l'ADNg WT. Un second couple d'amorces composé de PPME1_RP et de LBb1.3 permet une amplification de 669 paires de bases (pb) avec de l'ADNg d'une plante homozygote *ppme1*. Les conditions du thermocycleur (Applied Biosystem) sont les suivantes :

95°C 2 min / 95°C 30 sec / 59°C 30 sec / 72°C 45 sec / 72°C 5 min et 15°C ∞.

↑——————————┘ x 34 cycles.

Le mutant *pme23-1* :

Séquence d'ADN génomique de *PME23* :

La PME23 est codée par le gène At3g06830 (d'une taille totale de 2285 pb). La lignée SALK_035240 possède une insertion d'ADN-T, qui est représentée dans la séquence ci-dessous.

gacagaaaatgtaacatagcctcatgttctttcctaaaaccccagaaatagtattacaactcttttct
atattaaccccatcgatctttcgattcatttgttctaagcattgtgtataccaaacacgaaaagatcc
cttccccctaaaaaaaaaataaaaaaattcagagctagaaggggcctcatagttatagccacagttat
aggccccatctgctccatttttaacatgtgtagaaaatcatattagaaaagtaggaaaaaatacttga
gcaaagataccttttcgacctttagaatttttgtgaatatataggaaacagaaaaaATGGGTTCTGA
TGGTGACAAGAAGAAGAAATTCATCGTCGCCGGTAGTGTCTCCGGTTTTCTAGTCATCATGGTTGTCT
CTGTAGCCGTTGTAACGTCTAAACACTCTCCCAAAGACGATGAAAATCATATCAGAAAAACCACCAAA
GCGGTTCAAGCAGTTTGTGCACCCACTGACTTCAAAGACACTTGTGTTAACAGCTTAATGGGTGCTTC
TCCCGATTCCGATGACCCTGTCGACCTCATCAAACTCGGCTTCAAGGTCACTATCAAATCCATCAACG
AAAGCCTGGAAAAGGCCTCTGGAGATATCAAAGCCAAGGCTGACAAGAACCCAGAAGCAAAGGGTGCT
TTCGAGCTGTGTGAGAAGCTGATGATTGATGCTATCGATGACTTGAAGAAGTGTATGGATCATGGATT
CTCGGTTGATCAGATCGAGGTCTTTGTTGAGGATCTACGGGTTTGGCTAAGTGGCTCCATCGCATTCC
AGCAAACATGTATGGATTCCTTTGGGGAAATTAAGTCTAATCTTATGCAAGACATGCTCAAGATCTTC
AAAACATCAAGAGAGCTTAGTAGCAATAGCCTTGCCATGGTTACTAGAATCTCCACTCTTATCCCAAA
CTCCAACCTTACAGgtatcttttcaatttactaaagagatctccaaactaatccataaccaaccagtc
agaatcattggacagtaatgtgatgcttcaaaccagGACTAACCGGAGCTTTAGCAAAGTACGCGAGA
AAGCTTCTGTCTACAGAAGATAGTATCCCAACTTGGGTTGGACCAGAGGCACGACGGCTCATGGCAGC
TCAAGGAGGAGGACCTGGACCTGTGAAGGCTAATGCCGTGGTGGCTCAAGACGGAACTGGACAGTTCA
AGACTATCACCGATGCTCTAAATGCTGTGCCTAAAGGCAACAAAGTGCCATTCATCATTCACATCAAA
GAAGGTATCTACAAGGAGAAAGTTACGGTCACCAAGAAAATGCCTCACGTAACTTTCATCGGCGATGG
GCCAAACAAGACTCTAATCACCGGTAGTCTCAATTTCGGTATCGGCAAGGTCAAGACCTTCCTAACAG
CCACAATCAgtgagtttcaatctccaaactctaaaagtccacaaagagagattctaaacattaccaaa
ttattgtttcgcagCAATCGAAGGCGACCACTTCACAGCGAAGAACATCGGAATCGAGAACACAGCTG
GACCAGAAGGAGGACAAGCGGTGGCGTTAAGAGTCTCGGCTGATTACGCCGTATTCCACAGCTGTCAA
ATCGACGGGCACCAAGACACGTTATACGTTCACTCTCACCGGCAATTCTACCGTGACTGCACAGTCTC
GGGCACCGTCGATTTCATCTTCGGAGACGCGAAATGCATCCTCCAGAACTGTAAAATCGTCGTCCGAA
AACCTAACAAAGGTCAAACGTGTATGGTTACAGCTCAGGGACGAAGTAACGTCCGTGAATCGACAGGA
TTGGTGCTCCATGGCTGCCATATAACGGGAGATCCAGCGTATATTCCGATGAAATCTGTGAATAAAGC
TTACTTAGGAAGACCGTGGAAGGAGTTCTCGAGGACAATCATTATGAAAACGACGATCGATGACGTCA
TCGATCCGGCGGGATGGCTTCCCTGGAGTGGAGATTTTGCGCTCAAGACGCTATACTACGCCGAGCAT
ATGAATACTGGGCCTGGATCGAATCAGGCCCAAAGAGTTAAATGGCCCGGAATTAAGAAACTAACGCC
CCAAGATGCTCTTTTATACACTGGCGACAGATTCTTACGTGGCGATACGTGGATCCCACAAACACAAG
TTCCGTATACAGCTAAAGTGTAGgagattccaaattttgtaaattgatttaatttgtaaatgttttaa
aactaaaaactgtttgaagaatgattaattgattatgtcat

pme23-1 :

Couple d'amorce du gène *WT* :

PME23-1_FP	TGGCTCCATCGCATTCCAGCA	(Tm 58,83°C ; 57,14% GC)
PME23-1_RP	GCACAGCATTTAGAGCATCG	(Tm 59,60°C ; 50,00% GC)

Taille attendue 455 pb pour de l'ADNg WT et 384 pb pour de l'ADNc WT

Couple d'amorce du gène avec l'insert d'ADN-T (*pme23-1*) :

Amorce FP	LBb1.3	(Tm 60.00°C ; 64,00% GC)
PME23-1_RP	GCACAGCATTTAGAGCATCG	(Tm 60,00°C ; 64,00% GC)
Taille attendue	647 pb pour de l'ADNg avec insert d'ADN-T	

Pour la sélection du mutant *pme23-1* : La présence de l'insert a été vérifiée par PCR avec les couples d'amorces PME23-1_FP/PME23-1_RP et LBb1.3/PME23-1_RP. La taille attendue de l'amplification avec le premier couple d'amorces est de 455 paires de bases (pb) avec de l'ADNg WT. Le second couple d'amorces composé de PME23-1_RP et de LBb1.3 permet une amplification de 647 paires de bases (pb) avec de l'ADNg d'une plante homozygote *pme23-1*. Les conditions du thermocycleur (Applied Biosystem) sont les suivantes :

95°C 2 min / 95°C 30 sec / 59°C 30 sec / 72°C 45 sec / 72°C 5 min et 15°C ∞.

↑ ——————————— x 34 cycles.

Les mutants *pme48-1* et *pme48-2* :

Séquence d'ADN génomique de *PME48* :

La PME48 est codée par le gène At5g07410 (d'une taille totale de 1740 pb).

tcaaatcatccagaaaaaacaaaaaaaaacaaaaaaataataaaacaaaaaaatatctttttttttttc
taataaaaaaaaaaataataaataaatATGAGATACACAAATGTGTCCATTTTATTAGGCATGTTGGTGATCTTTG
TTTCACCAATGGTGTTCGCAGATGATTTGACACCAATCCCAGAGGGCAAACCCCAAGTGGTGCAGTGGTTCAATA
CCCACGTTGGTCCATTGGCTCAACGTAAAGGCTTAGATCCTGCTCTCGTAGCTGCTGAGGCTGCTCCACGTATCA
TCAACgtataactcacacttgatttttcccaaactcatcattgtaacaatatattttaacataaatttttttgaaaa
catgtaaatattattgcagGTGAATCCAAAGGGAGGTGAATTCAAAACACTAACAGACGCAATAAAGAGCGTTCC
CGCAGGGAACACAAAGCGGGTGATCATAAAGATGGCTCATGGTGAGTACAGAGAGAAGGTCACTATCGACAGGAA
CAAACCCTTCATTACATTGATGGGACAACCCAATGCCATGCCTGTTATCACCTACGACGGTACCGCCGCCAAGTA
TGGAACCGTTGATAGTGCCTCTCTCATTATCTTATCCGACTATTTCATGGCCGTTAACATCGTCGTTAAGgtaag
tgatcctactaatatattatacatatctatgagactagtcgactatttcatggtcgagtgatttatttttttgta
tatgtagAACACTGCACCGGCACCAGATGGTAAAACTAAGGGAGCACAAGCCTTATCCATGAGAATCTCCGGAAA
CTTTGCTGCTTTCTACAACTGCAAATTCTACGGTTTCCAAGATACAATCTGTGATGATACCGGAAACCATTTCTT
CAAGGATTGTTACGTCGAAGGAACATTCGATTTCATCTTCGGAAGTGGAACCTCTATGTACTTGgtacgtaacat
ctcatacatattttctttatacataaagtgtgaaatctctaacgcatgcttgaattcaaaagGGAACACAATTGC
ACGTGGTTGGAGACGGTATTAGAGTGATCGCAGCGCATGCAGGAAAGAGCGCAGAAGAAAAGAGTGGATACTCTT
TCGTGCACTGCAAGGTGACTGGAACTGGAGGAGGAATCTATTTGGGAAGAGCATGGATGAGCCACCCTAAGGTTG
TCTATGCCTACACCGAGATGACCAGCGTTGTCAACCCCACCGGATGGCAAGAAAACAAGACTCCCGCACATGACA
Agtaagtacacttttcacactacatagaaaatgttgtgaatatcacacaatcggtccatctcccttatgatcttt
ctatcaaaaatgacagGACCGTGTTCTACGGAGAGTACAAGTGTTCAGGACCAGGGTCACACAAAGCCAAGAGAG
TGCCATTCACACAAGACATCGACGACAAAGAAGCTAACTGTTTCCTATCCCTCGGCTACATCCAAGGATCCAAGT
GGCTTCTCCCACCACCCGCTTTGTAAattctttaatatcaacctattaaaattaaaattaaaacgtaaaactaaa
attaaaacttctacttacatccttttttcaccgaaatatgtttatcggtgtatattatttttgtcgatattttct

ttcaatttccagaaatcctctcttcttaaatatcatggaggagttgagatttatgtaattttggtttcattata
ataaaatgttgtttccgttcat

pme48-1 :

La lignée SALK_122970 possède une insertion d'ADN-T dans la région 3' non traduite (Figure 42).

Couple d'amorce du gène *WT* :

PME48-1_FP TGACAGGACCGTGTTCTACG (Tm 59,74°C ; 55,00% GC)
PME48-1_RP GAAGAGAGGATTTCTGGAAATTGA (Tm 60,08°C ; 37,50% GC)
Taille attendue 315 pb pour de l'ADNg WT.

Couple d'amorce du gène avec l'insert d'ADN-T (*pme48-1*) :

PME48-1_FP TGACAGGACCGTGTTCTACG (Tm 59,74°C ; 55,00% GC)
Amorce Rev LBb1.3 (Tm 60.00°C ; 64,00% GC)
Taille attendue 402 pb pour de l'ADNg avec insert d'ADN-T.

pme48-1 : La présence de l'insert a été vérifiée par PCR avec les couples d'amorces PME48-1_FP/PME48-1_RP et PME48-1_FP/LBb1.3. La taille attendue de l'amplification avec ce couple d'amorces est de 315 paires de bases (pb) avec de l'ADNg WT. Un second couple d'amorces composé de PME48-1_FP et de LBb1.3 permet une amplification de 402 paires de bases (pb) avec de l'ADNg d'une plante homozygote *pme48-1*. Les conditions du thermocycleur (Applied Biosystem) sont les suivantes :

95°C 2 min / 95°C 30 sec / 59°C 30 sec / 72°C 45 sec / 72°C 5 min et 15°C ∞.

↑ ——— x 34 cycles.

pme48-2 :

La lignée SALK_007330 possède une insertion d'ADN-T dans le 4ème exon (Figure 43).

Couple d'amorce du gène *WT* :

PME48-2_FP CTGGAGGAGGAATCTATTTGG (Tm 59,74°C ; 55,00% GC)
PME48-2_RP GAAGAGAGGATTTCTGGAAATTGA (Tm 60,08°C ; 37,50% GC)
Taille attendue 526 pb pour de l'ADNg WT

Couple d'amorce du gène avec l'insert d'ADN-T (*pme48-2*) :

PME48-2_FP	CTGGAGGAGGAATCTATTTGG	(Tm 59,74°C ; 55,00% GC)
Amorce Rev	LBb1.3	(Tm 60.00°C ; 64,00% GC)

Taille attendue 289 pb pour de l'ADNg avec insert d'ADN-T

pme48-2 : La présence de l'insert a été vérifiée par PCR avec les couples d'amorces permettant la vérification de celle-ci. La taille attendue de l'amplification avec ce couple d'amorces est de 526 paires de bases (pb) avec de l'ADNg WT. Un second couple d'amorces composé de PME48-2_FP et de LBb1.3 permet une amplification de 289 paires de bases (pb) avec de l'ADNg d'une plante homozygote *pme48-2*. Les conditions du thermocycleur (Applied Biosystem) sont les suivantes :

95°C 2 min / 95°C 30 sec / 59°C 30 sec / 72°C 45 sec / 72°C 5 min et 15°C ∞.

x 34 cycles.

Annexe 4

Création de la lignée *PRO$_{PME48}$:sYFP* :

Une amplification du promoteur *PRO$_{PME48}$* a été réalisée puis il a été inséré dans le vecteur plasmidique pPLV06 (De Rybel *et al.,* 2011). Une vérification de la présence du plasmide contenant la séquence *PRO$_{PME48}$* a été réalisée par PCR avec les amorces M13 For / Rev3PPE50 ainsi que For1PPE50 / M13 -22 (Figure 70 A et B). Les tailles attendues avec ces deux couples d'amorces lors d'une PCR de criblage des colonies d'*E. coli* sont respectivement de 600 pb (Figure 70 A) et 1 kb (Figure 70 B).

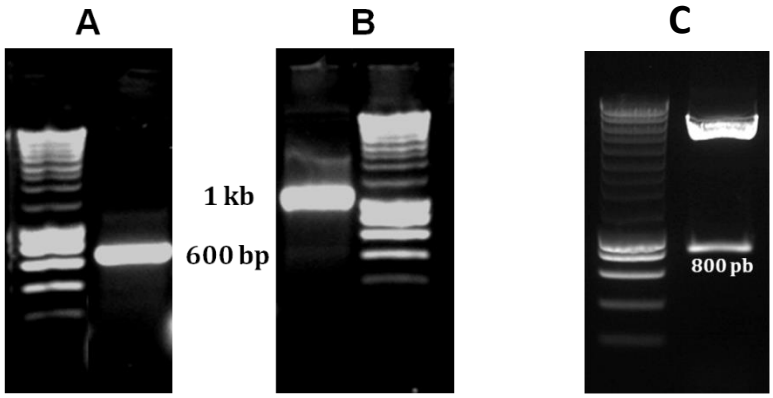


Figure 70 : Gels correspondants au criblage des colonies d'*E.coli* recombinantes (A et B) et à une digestion contrôle du plasmide par l'enzyme *BamH*I (C).
A. Migration du produit de la PCR avec le couple d'amorce M13/Rev3PPE50, ayant une amplification de 600 pb. B. Migration du produit PCR avec le couple d'amorces For1PPE50/M13-22, ayant une amplification de 1,1 kb. C. Une bande est observée à 800 pb, taille correspondant à la libération du fragment *SV40-sYFP*, tandis que le reste du plasmide linéarisé par la digestion se situe au dessus.

Une digestion contrôle avec l'enzyme *BamH*I (Figure 70 C) qui coupe le plasmide en deux sites a permis de libérer un fragment de taille attendue (800 pb) correspondant à la *SV40-sYFP*.

Annexe 5

Liste des publications :

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

Une partie de cet article est présentée dans l'Introduction et dans la partie Résultats.

2. **Paynel F, Leroux C, Surcouf O, Schaumann A, Pelloux J, Driouich A, Mollet JC, Lerouge P, Lehner A*, Mareck A*.** Kiwi fruit PMEI inhibits PME activity, modulates root elongation and induces pollen tube burst in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regulation.* **2014. 74 :** 285-297. *Equal contribution of the senior authors.

Une partie de cet article est présentée dans la partie Résultats.

3. **Leroux C, Bouton S, Kiefer-Meyer MC, Ndinyanka Fabrice T, Mareck A, Guénin S, Fournet F, Ringli C, Pelloux J, Driouich A, Lerouge P, Lehner A*, Mollet JC*.** *PECTIN METHYLESTERASE48* is involved in *Arabidopsis* pollen grain germination. *Plant Physiology*. **2015. 167.** 347-380. *Equal contribution of the senior authors.

Cet article est présenté dans la partie Résultat : III. 3. CARACTERISATION DU MUTANT HOMOZYGOTE *pme48-1* :

Plants **2013**, *2*, 107-147; doi:10.3390/plants2010107

OPEN ACCESS

plants

ISSN 2223-7747

www.mdpi.com/journal/plants

Review

Cell Wall Composition, Biosynthesis and Remodeling during Pollen Tube Growth

Jean-Claude Mollet *, Christelle Leroux, Flavien Dardelle and Arnaud Lehner

Laboratoire de Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale, EA4358, IRIB, Normandy University, University of Rouen, 76821 Mont Saint-Aignan, France; E-Mails: christelle.leroux@etu.univ-rouen.fr (C.L.); flavien.dardelle@gmail.com (F.D.); arnaud.lehner@univ-rouen.fr (A.L.)

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: jean-claude.mollet@univ-rouen.fr; Tel.: +332-351-466-89; Fax: +332-351-466-15.

Received: 13 December 2012; in revised form: 19 February 2013 / Accepted: 19 February 2013 / Published: 7 March 2013

Abstract: The pollen tube is a fast tip-growing cell carrying the two sperm cells to the ovule allowing the double fertilization process and seed setting. To succeed in this process, the spatial and temporal controls of pollen tube growth within the female organ are critical. It requires a massive cell wall deposition to promote fast pollen tube elongation and a tight control of the cell wall remodeling to modify the mechanical properties. In addition, during its journey, the pollen tube interacts with the pistil, which plays key roles in pollen tube nutrition, guidance and in the rejection of the self-incompatible pollen. This review focuses on our current knowledge in the biochemistry and localization of the main cell wall polymers including pectin, hemicellulose, cellulose and callose from several pollen tube species. Moreover, based on transcriptomic data and functional genomic studies, the possible enzymes involved in the cell wall remodeling during pollen tube growth and their impact on the cell wall mechanics are also described. Finally, mutant analyses have permitted to gain insight in the function of several genes involved in the pollen tube cell wall biosynthesis and their roles in pollen tube growth are further discussed.

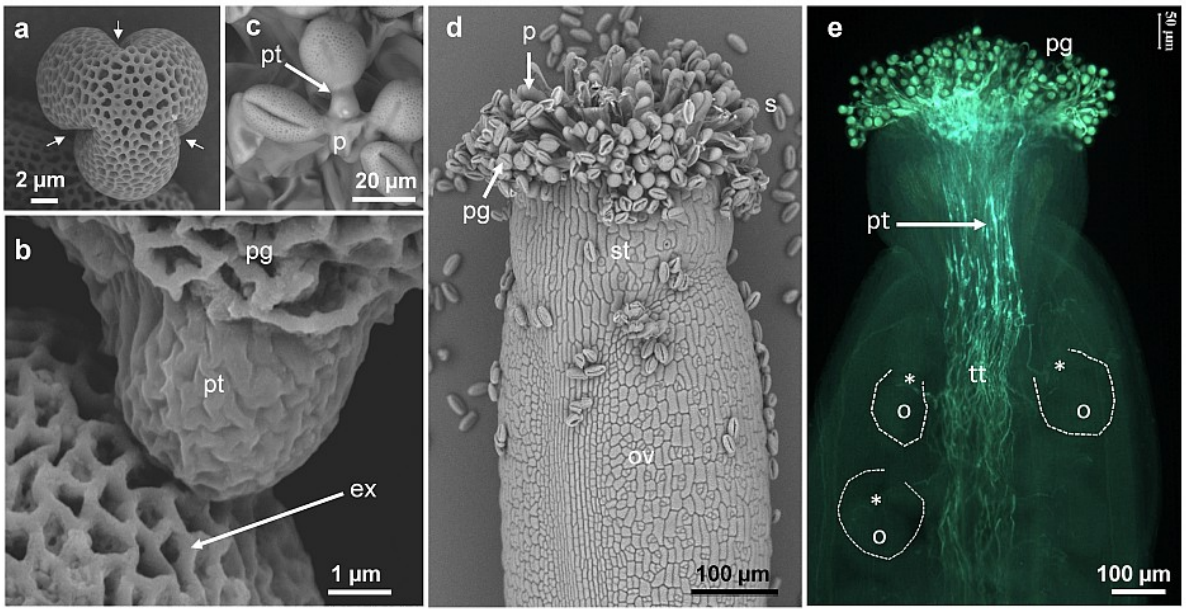
Keywords: biosynthesis; callose; cellulose; cell wall; pectin; glycoside hydrolases; pollen tube growth; remodeling; xyloglucan

---

1. Introduction

Fertilization of flowering plants requires the delivery of two sperm cells carried by the pollen tube, a fast tip-polarized growing cell, to the egg cell. In plants such as *Arabidopsis thaliana*, this process begins with the adhesion of the pollen grains on the stigmatic papillae after the pollen coat has contacted the papillae (Figure 1a–d). Following hydration of the pollen grain, the pollen tube emerges either from one of the three pollen grain apertures (Figure 1c) or through the exine wall (Figure 1e) [1]. Then, pollen tubes invade the cell wall of the papillae (Figure 1b–d), enter the short style, and grow in the apoplast of the specialized transmitting tract cells (Figure 1b) enriched in extracellular nutrient [2,3].

Figure 1. Scanning electron (**a**–**d**) and fluorescent (**e**) micrographs of *Arabidopsis thaliana* (**a**) dry pollen grain showing the three apertures (arrows), (**b**) emerging pollen tube from a pollen grain, (**c**) pollen germination on the papillae, (**d**) self-pollinated pistil with adhering pollen grains on the papillae and (**e**) aniline blue staining of self-pollinated stigma showing pollen tubes within the transmitting tract and reaching the ovules (dashed line and *). ex. exine, p. papillae, o. ovule, ov. ovary, pg. pollen grain, pt. pollen tube, s. stigma, st. style, tt. transmitting tract.



During this invasive growth, pollen tubes are guided to the ovules via signals that need to pass through the cell wall to reach their membrane-associated or intracellular targets [4–11]. In addition to being the interface between the tube cell and the surrounding (culture medium or female tissues), the cell wall of pollen tubes plays a crucial role in the control of the cell shape, in the protection of the generative cells and in the resistance against turgor pressure induced tensile stress [12,13]. Thus, a tight control of cell wall deposition and remodeling during pollen tube growth is required to fulfill all these functions.

In this review, we describe our current knowledge on the biosynthesis, distribution and biochemistry of cell wall polymers including pectin, hemicellulose, cellulose and callose from several pollen tube species (including plants with dry stigma and solid style like *Arabidopsis thaliana* and

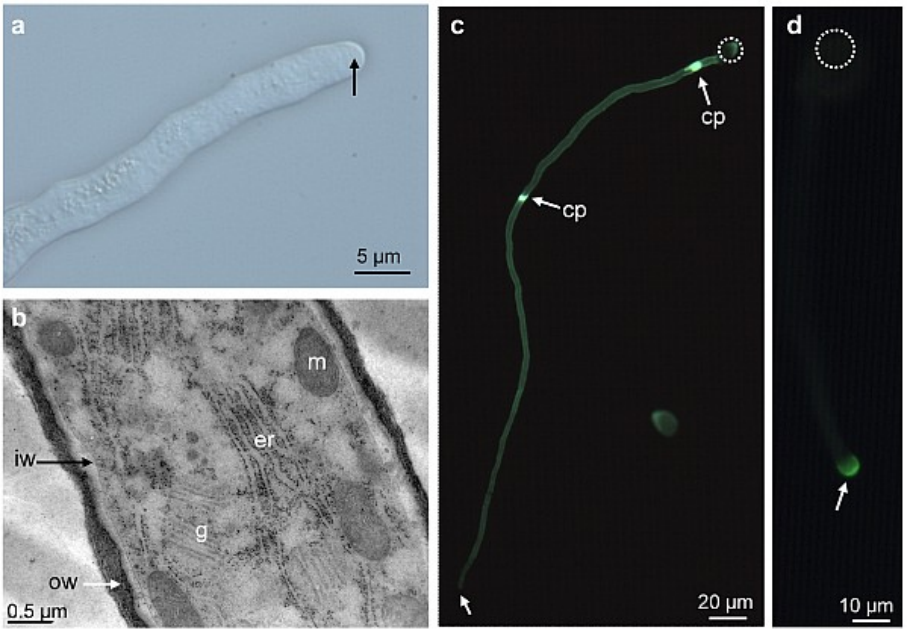
tobacco and wet stigma and hollow style like in lily). The structure and functions of arabinogalactan-proteins in pollen tube growth will not be addressed as it was recently detailed by [14]. Finally, the enzymes from the male gametophyte and the female sporophytic counterpart possibly involved in the cell wall remodeling during pollen tube growth are further discussed in relation with the mechanical properties of the cell wall.

2. Cell Wall Polymers in Pollen Tubes

Despite the importance of pollen tubes for the delivery of the sperm cells to the egg, little is known about the underlying molecular mechanisms that regulate the mechanical interaction of pollen tubes with the female floral tissues and only very scarce data are available concerning the biosynthesis and remodeling of the pollen tube cell wall.

Pollen tubes in most species display in the tip region a clear zone like in *A. thaliana* (Figure 2a), composed of numerous Golgi-derived vesicles that migrate toward the apex in the cell cortex and accumulate in an annulus-shaped region adjacent to the extreme tip (apical flank) where they fuse with the plasma membrane to sustain pollen tube growth [15]. At the extreme apex and in the distal region of the pollen tube, endocytosis takes place possibly by clathrin-dependent and -independent pathways [10,16–19].

Figure 2. *A. thaliana* pollen tube grown *in vitro*. (**a**) High magnification of eight-hour-old pollen tube grown in liquid medium showing the clear zone at the tip (arrow). (**b**) Transmission electron micrograph of high pressure-freeze substituted pollen tube showing the two cell wall layers. (**c**) Pollen tube stained with decolorized aniline blue showing the callose wall and two callose plugs. Note the absence of staining at the tip (arrow). (**d**) Immunolocalization of highly methylesterified HG with LM20 in a pollen tube showing a strong labeling at the tip (arrow). cp: callose plug, er: endoplasmic reticulum, g: Golgi apparatus, iw: inner wall, m: mitochondria, ow: outer wall. Dotted circle indicates the location of the pollen grain.



Transmission electron microscope observations of *in vitro* and *in vivo* grown pollen tubes from many species including lily [20], tobacco [21,22], *A. thaliana* [23–26] and in several but not all the gymnosperm investigated species like *Pinus sylvestris* [27], *Podocarpus nagi* or *Pinus banksiana* [28] showed a cell wall composed of two layers at the shank of the pollen tube: a fibrillar outer layer and a weakly electron-dense inner wall (Figure 2b). In contrast, the inner cell wall layer is generally lacking at the pollen tube tip in normal condition [20,23,24,27].

2.1. Distribution of Carbohydrate Epitopes in the Pollen Tube Cell Wall

Distribution of pollen tube cell wall polymers was investigated by using mostly cytochemical reagents, enzymes and/or antibodies (Table 1). In most of the immunolocalization studies, monoclonal antibodies (mAbs) are applied on the whole pollen tube [24–32], allowing a cell surface labeling that may mislead in the interpretation as epitopes may have been masked by other polymers. To avoid this problem, enzyme treatments were sometimes applied on fixed tubes or pollen tubes were embedded in resin and sectioned [33]. Another possible artifact is caused by the slow penetration of the chemical fixative that arrests pollen tube growth while exocytosis is still ongoing, or the other way round, that arrests of enzymatic reactions in the wall while the tube is still growing.

Table 1. List of probes (antibody, cytochemical reagent and enzyme) used to detect pollen tube cell wall polysaccharides.

Probe [a]	Polysaccharide [b]	Epitope recognized [c]	Refs.
Antibody			
CCRC-M1	XyG	α-Fuc-(1→2)-β-Gal	[34]
LM15	XyG	XXXG, XXLG, XLXG, XXGG	[35]
JIM5	weakly methylesterified HG	α-MeGalA-(1→4)-α-GalA$_{(4)}$-(1→4)-α-MeGalA	[36]
LM19	weakly methylesterified HG	α-GalA-(1→4)$_{(4)}$	[37]
JIM7	partially methylesterified HG	α-GalA-(1→4)-α-MeGalA$_{(4)}$-(1→4)-α-GalA	[36]
LM20	partially methylesterified HG	α-MeGalA-(1→4)$_{(4)}$	[37]
LM8	xylogalacturonan	unknown	[38]
LM5	(1→4)-β-D-galactan (RG-I)	β-Gal-(1→4)$_{(3)}$	[39]
LM6	(1→5)-α-L-arabinan (RG-I)	Branched α-Ara-(1→5)$_{(5)}$	[40]
LM13	(1→5)-α-L-arabinan (RG-I)	Linear α-Ara-(1→5)$_{(5)}$	[41]
LAMP	callose	β-Glc-(1→3)$_{(5)}$	[42]
Anti-RG-II	Monomeric and dimeric RG-II	unknown	[43]
Cytochemical reagent			
Calcofluor white	β-Glucan	na	
Aniline blue	callose	na	[44]
PI	HG	na	[45]
Protein			
CBH-I	cellulose	na	[22]
CBM3a	Crystalline cellulose	na	[46]

[a] CCRC-M. Complex Carbohydrate Research Center-Monoclonal, LM, Leeds Monoclonal, JIM, John Innes Monoclonal, LAMP, LAMinarin Pentaose, RG-II. Rhamnogalacturonan-II, PI. Propidium iodide, CBH-I. Cellobiohydrolase-I, CBM3a. Cellulose binding module3a. [b] XyG. Xyloglucan, HG. Homogalacturonan, RG-I. Rhamnogalacturonan-I. [c] Ara. arabinose, Fuc. fucose, Gal. galactose, GalA. galacturonic acid, Glc, glucose, MeGalA, 6-*O*-methyl-galacturonate, na. not applicable. For more information see [47].

Distribution of cell wall polymers in pollen tubes was investigated in plant species of the angiosperm eudicots such as *A. thaliana* [23–26], *Nicotiana tabacum* [21,22,29], *Solanum chacoense* [30], *Camellia japonica* [31], *Torenia fournieri* [32] and *Actinidia deliciosa* [33] as well as angiosperm monocots like *Lilium longiflorum* [48,49] and *Zea mays* [50]. More recent studies have focused on the gymnosperms like *Pinus sylvestris* [27], *Picea meyeri* [51] and several others [28,52].

One of the main differences between the primary cell wall of somatic and pollen tube cells is despite its presence, the low abundance of cellulose, a β-(1→4)-glucan. Instead, callose, a β-(1→3)-glucan, is the main cell wall polysaccharide. Callose is mostly localized in the inner cell wall and is absent from the tube tip of most angiosperm pollen tubes [53,54] including *A. thaliana* (Figure 2c) [25]. In contrast, in *Cycas* and several *Pinus* species, callose was not detected in the pollen tube wall by aniline blue staining [28]. However, in *P. sylvestris*, a strong fluorescence was detected with aniline blue at the tube tip [27]. In addition, callose is deposited at periodic intervals to form callose plugs that maintain the tube cell in the apical expanding region of angiosperm pollen tubes (Figure 2c) and separates the viable from the degenerating region of the tube [12]. In tobacco using CBH-I-gold and LAMP MAb [22] and in *A. thaliana* using CBM3a [26] and LAMP MAb [25], callose and cellulose are localized in the plugs and in the inner cell wall of the pollen tube. In contrast, in long-living and slow-growing gymnosperm pollen tubes, the callose plug deposition is apparently not a consistent feature as well as the permanent callose wall in pollen tubes [52]. This observation suggests that in the evolution of flowering plants a permanent callose wall and callose plug deposition appeared through the short-lived and fast-growing pollen tubes of angiosperms [55]. Cellulose is present in the entire cell wall of pollen tubes with a weaker staining with calcofluor white or CBH-I-gold labeling at the tip in most angiosperms [22,25,27,30]. Recently, Chebli *et al*. [26] using CBM3a that binds to crystalline cellulose found two populations of *A. thaliana* pollen tubes displaying intense or weak labeling at their tips suggesting that the labeling was related to temporal growth rate. Similarly, in *T. fournieri*, the distribution of cellulose changed temporally and spatially, being abundant in freshly germinated pollen tubes, and absent from the tube tip of older pollen tubes [32]. Using atomic force microscopy, Wu *et al.* [32] also revealed that cellulose microfibrils were more abundant in the apical region of slow-growing tubes whereas only few microfibrils were observed in the auxin-stimulated pollen tubes suggesting a correlation between cellulose abundance and pollen tube growth. In Conifers, pollen tubes have cellulose in the entire cell wall and may contain more cellulose deposited at the tube tip, which may explain the slower growth [52,56].

Pectins are complex polymers consisting of homogalacturonan (HG), which can be methyl- and acetyl-esterified, rhamnogalacturonan-I (RG-I), rhamnogalacturonan-II (RG-II), and xylogalacturonan [57]. HG is a polymer of repeated units of (1→4)-α-D-galacturonic acid. Upon block wise action of pectin methylesterases on methylesterified HG, several parallel HG chains can be cross-linked via the interaction of the negative charges of the carboxyl groups of galacturonic acid and calcium [58]. RG-II has a galacturonan backbone with four well defined oligosaccharides composed of unusual sugars such as apiose, aceric acid and 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid (Kdo) of unknown function [57]. RG-II is present in the primary cell wall of all higher plants and its structure is evolutionarily conserved in the plant kingdom. In the cell wall, it exists predominantly in the form of a dimer that is cross-linked by a borate di-ester between two apiosyl residues [57]. On the other hand, RG-I consists of the repeating disaccharide unit, (1→4)-α-D-galacturonic acid-(1→2)-α-L-rhamnose. On the rhamnosyl

residues, a wide variety of side chains can be detected ranging from monomers to large oligosaccharides such as (1→4)-β-D-galactan, (1→5)-α-L-arabinan, and/or type I arabinogalactan [57].

Most of the studies on the pectic wall of the pollen tube focused on the detection of HG domains using the JIM5 and JIM7 mAbs (Table 1). To date, localization data of other pectic domains such as xylogalacturonan and RG-I side chains in the pollen tube wall are scarce. Immunofluorescence labeling of weakly and highly methylesterified HG with JIM5 and JIM7 or the newly introduced LM19 and LM20 depends clearly on the species, the *in vitro* growth condition and the growth rate of the pollen tube [59]. It is however generally observed that in most angiosperms, highly methylesterified HG is mostly detected at the tip (Figure 2d) and weakly methylesterified HG epitopes are preferentially detected either in the entire pollen tube or in the pollen tube except in the tip region as shown in the Brassicacae (*A. thaliana*) [25], Solanaceae (wild potato, tobacco, petunia), Oleaceae (jasmine), Poaceae (corn) [60], Scrophulariaceae (*T. fournieri*) [32] and Liliaceae (lily) [48,49]. Similar observations were obtained in *Picea meyeri* [51] and *Picea wilsonii* [61] pollen tubes. In other gymnosperm species like *P. macrophyllus* and *P. banksiana,* pollen tubes were not labeled with JIM5 and JIM7 using electron microscopy observation [28].

Based on Elisa assays and dot-blots, it was clearly shown that JIM5 and JIM7 as well as LM19 and LM20 have specific but also overlapping binding capabilities to different degrees of methylesterification (DM) of HG domains after random or blockwise action of pectin methylesterases (PME) [37,62]. LM20 binds to HG with DM ranging between 85 and 16%, whereas LM19 binds to HG with DM between 66% and the demethylesterified form [37]. Using these data and assuming that PME has a blockwise action to allow calcium cross-linking in the shank of the tube, we can estimate that the DM of HG at the tip is probably over 70% and back from the tip, the DM is less than 15%. In lily, this change of methylesterification level occurs between 15 and 20 μm from the pole of the pollen tube corresponding exactly to the transition zone between the apical dome and the cylindrical shank of the cell [63]. In *A. thaliana*, this modification takes place closer to the tip (between 3 and 10 μm) [26]. Recently, propidium iodide (PI) was used to probe low methylesterified HG on living *A. thaliana* and *L. longiflorum* pollen tubes, which allowed following the dynamics of the pectin during pollen tube growth. The fluorescence of PI was detected at the tip and the shank of the pollen tubes with PI fluorescence oscillations preceding growth rate oscillations [45]. Finally, in certain species such as lily [49], *Ornithogalum* [59], tobacco [54] and others [60], periodic ring-like labeling patterns of weakly methylesterified HG were clearly visible along the pollen tube and originated from cell wall deposition during the slow growth pulses [54].

Side chains of RG-I are also present in the cell wall of pollen tubes. Using LM6 and/or LM13, epitopes associated with arabinan are evenly distributed along the entire pollen tube in *A. thaliana* [25], *A. deliciosa* [33] and *P. wilsonii* [61]. At the electron microscopy level, arabinan is mostly detected in the outer cell wall layer in *A. thaliana* [25] consistent with the location of other pectic motifs such as HG. Galactan is also detected in *A. thaliana* pollen tubes but the labeling intensity is weak [25] and almost absent in *Picea* [61].

Finally, RG-II, the major boron-binding component of the cell wall, is detected in the entire lily pollen tube cell wall [43] but is not in *Picea* [61].

Xyloglucan (XyG) is the major hemicellulosic polysaccharide of the primary cell wall of angiosperm eudicots and non-commelinid monocots [64,65]. Classic XyG consists of a (1→4)-β-D-

glucan backbone substituted with xylose, galactose-xylose or fucose-galactose-xylose motifs [66]. In the primary cell wall, XyG interacts with cellulose via hydrogen bonds and participates in the control of cell expansion [67]. The presence of fucosylated and galactosylated XyG was assessed only recently in *A. thaliana* pollen tubes using CCRC-M1 [25,68] and LM15 [25]. Labeling with both mAbs is detected in the entire pollen tube wall and at the electron microscopy level; it was shown that XyG is present in the outer and inner layers of the pollen tube cell wall [25] suggesting a possible interaction with cellulose microfibrils.

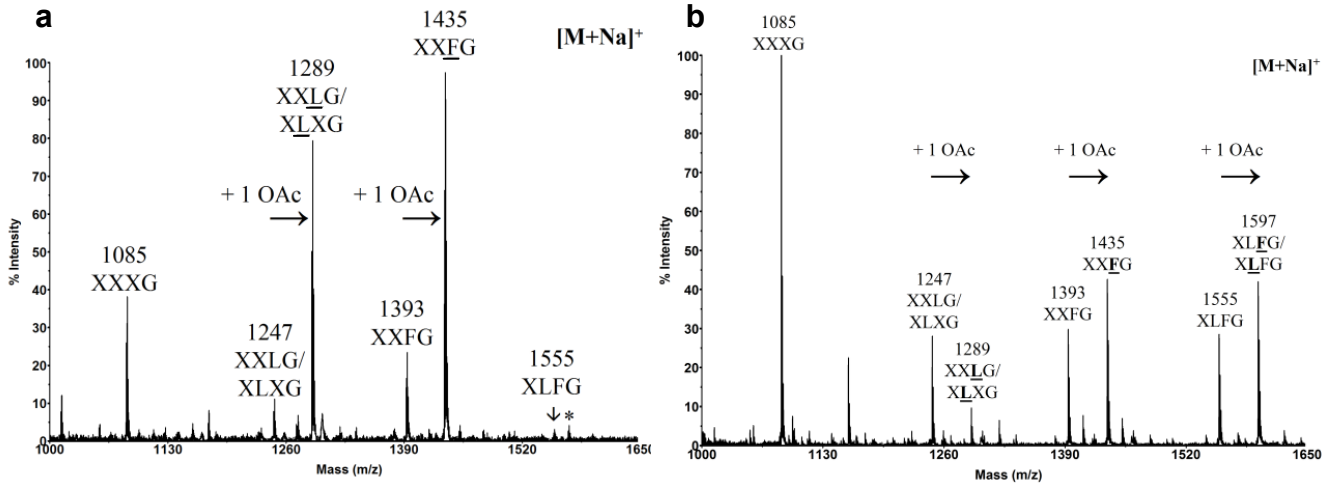
All these data reveal a common organization of the pollen tube cell wall in the species from the angiosperm eudicots and the non-commelinid monocots. In contrast, with the slow-growing and short-traveling gymnosperm pollen tubes, it appears that the distribution of cell wall polymers, especially the callose, is altered [69]. However, more studies using the probes listed in Table 1 are required to draw a general conclusion. To date, the investigation on the distribution of RG-II in pollen tubes is very limited but with the development of new specific probes for each individual side chains, the gap might be soon overcome. Another attracting method that may develop in the near future in the study of cell wall dynamics during pollen tube growth is the use of sugar analogs compatible to click chemistry associated with *in vivo* cell imaging [70]. In this method, sugar analogs are metabolically incorporated into cell wall polymers and subsequently labeled with covalent linkages to fluorescent probes [71] as shown with alkynylated fucose analog incorporated in the pectin of *A. thaliana* root cell wall [72]. This method will allow for insight into the dynamics and recycling of cell wall polymers on living pollen tubes.

2.2. Chemical Composition of Pollen Tube Cell Wall

Only very scarce studies have focused on the biochemical characterization of the pollen tube cell wall. The most striking point observed in the few biochemical characterizations of the cell wall of tobacco, *C. japonica*, lily, tulipa and *A. thaliana* pollen tubes is consistently the high level of arabinosyl residues [25,73,74]. In *A. thaliana*, Ara represents 43%, Glc 20%, GalA 11%, Gal 8% and Rha 5% of the total sugars [25]. Linkage analyses show that most of the arabinosyl residues are T-Ara, 5-linked and to a lesser extent 2,5-linked. These data indicate that the pectin of *A. thaliana* pollen tube cell wall is composed of 6% HG, 5% RG-I backbone harboring abundant chains of (1→5)-α-L-arabinan. This common feature suggests that arabinan may have an important role during pollen tube growth. Finally, linkage analyses also indicate (1) that most of the Glc is 3-linked indicating the abundance of callose [25,73] and (2) confirm that XyG is also present based on the detection of 4-Glc, 2-Xyl and T-Xyl, T-Gal and Fuc residues [25]. According to the one letter code proposed by Fry *et al*. [75], the unsubtituted glucosyl residue of the backbone is represented by the letter G. X, L and F represent the substitution by xylose, galactose-xylose and fucose-galactose-xylose, respectively. XyG can also be *O*-acetylated generally on the galactose, indicated by an underline letter, but the biological significance of *O*-acetylation is not known yet [76]. Generally, every four or five glucoses of the glucan backbone are not substituted allowing the cleavage of the polymer by *endo*-glucanase. The small oligosaccharides can then be analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry, known as OLIMP method (OLIgosaccharide Mass Profiling) [77]. Using this technique, the fine structure of *A. thaliana* pollen tube XyG was recently determined. It revealed significant differences with the XyG from

vegetative organs such as leaves (Figure 3). Whereas XXXG is the main fragment of leaf XyG [25,78], the fucosylated and *O*-acetylated fragments (XXFG and XLFG) are the major motifs in *A. thaliana* pollen tube XyG [25] suggesting an important role of these two features in pollen tube growth and/or in the interaction with the female tissues.

Figure 3. MALDI-TOF mass spectra of *endo*-glucanase-generated XyG fragments from *A. thaliana* (**a**) Spectrum from pollen tubes. (**b**) Spectrum from mature leaves. The structures of the XyG fragments are shown according to the nomenclature proposed by Fry *et al*. [19]. Underlined structures represent *O*-acetylated side chains (+1 *O*Ac). The asterisk indicates the signal of XLFG fragment with K^+ adduct ion instead of Na^+. From Dardelle *et al*. [25], Copyright American Society of Plant Biologists [79].



Used in the mid-90s to study the cell wall composition of algae [80] and later widely adopted to screen flax and *A. thaliana* cell wall mutants [81,82], Fourier transform infrared (FT-IR) microspectrometry associated with principal component analysis was recently used to study the effect of hormones, minerals or drugs on the cell wall composition of elongating pollen tubes [51,83]. It shows that treatments of *P. meyeri* pollen grains with brefeldin A, a drug able to inhibit the secretory pathway, reduce the pollen germination and tube growth by disrupting the secretory vesicles at the tip and significantly decrease the content of pectin in the apical region [84]. Treatments with nitric oxide donor or NO synthase inhibitor induce the accumulation of acidic HG and callose in the tip region [85]. Interestingly, blocking the release of intracellular calcium with drugs significantly alters the cell wall structure in *Picea* pollen tubes with the accumulation of callose and the disappearance of methylesterified HG at the tube tip [61]. Finally, treatment of *T. fournieri* pollen tubes with auxin promotes the growth by stimulating the synthesis of pectin, reducing the cellulose density and modifying the orientation of cellulose microfibrils as observed by atomic force microscopy [32]. However, whereas the vibrations associated with cellulose, phenolics, the methylester and the carboxyl groups of GalA are well assigned by FT-IR, the technique does not allow discriminating clearly other pectin motifs such as arabinan and/or galactan side chains of RG-I in the cell wall network. It is, however, a non destructive method that may be convenient to use in the future for determining the overall composition of pollen tube cell wall mutants compared to wild type. It may also be useful to follow the evolution of the cell wall composition in different portions of the pollen tube during growth.

Due to the technical challenges involved such as the labor intensive work to collect enough material, the number of studies focused on the biochemistry of pollen tube cell wall is limited. As a consequence, it does not permit to assess clearly the differences in the cell wall composition between angiosperm (monocot and eudicot) and gymnosperm. However, with the development of more sensitive equipments such as mass spectrometry, more information may be soon collected.

3. Cell Wall Polymer Biosynthesis in Pollen Tubes

3.1. Pectin Biosynthesis

Pectin represents one of the main carbohydrate polymers found in the cell wall of pollen tubes. Given the complexity of its structure, it is predicted that 67 different glycosyltransferases, methyltransferases and acetyltransferases are required for its biosynthesis [86]. The synthesis of the different pectin motifs is carried out in the Golgi apparatus and they are secreted via Golgi-derived vesicles [87].

3.1.1. Homogalacturonan

The synthesis of HG requires the activity of GALACTURONOSYLTRANSFERASEs (GAUTs) that was biochemically demonstrated in *Petunia axillaris* pollen tubes [88]. In *A. thaliana*, the multigenic family of *GALACTURONOSYLTRANSFERASE (GAUTs)* is composed of 15 genes [86,89] whose members are related to another family representing the *GALACTURONOSYLTRANSFERASE-LIKE* (*GATLs*), composed of 10 genes [90]. *GAUT1* (CAZy family GT8) is a galacturonosyltransferase gene that first was shown to be functionally implicated in the HG synthesis in *A. thaliana* vegetative organs [91]. The inactivation of *GAUT8* induces a reduction of the level of HG epitopes, a decrease of the amount of GalA in the cell wall of vegetative organs and a partial sterile phenotype [92]. Among all these genes, 13 *GAUTs* and 8 *GATLs* are expressed in the inflorescence of *A. thaliana* [89,90]. According to transcriptomic data, only two *GAUTs* (*GAUT13* and *GAUT14*) and two *GATLs* (*GATL4* and *GATL7*) are expressed in pollen tubes [90,93]. Interestingly, the *GALT4* expression seems to be pollen specific and is highly expressed in *A. thaliana* pollen tubes [90], which may suggest its implication in the synthesis of HG in pollen tubes but functional studies are necessary to assess the role of these genes in pollen tube growth.

3.1.2. Xylogalacturonan

In *A. thaliana*, the gene At5g33290 is involved in the xylogalacturonan biosynthesis, but the *xgd1* (*xylogalacturonan deficient1*) mutants do not display any visible pollen or pollen tube phenotype [94]. Other xylogalacturonan biosynthesis genes are undoubtedly implicated in this process but it remains to be established.

3.1.3. Rhamnogalacturonan-I

The backbone of RG-I is made of a repeating disaccharide α-(1→4)-D-GalA-α-(1→2)-L-Rha with Rha residues that can be substituted with galactan, arabinan and/or arabinogalactan [95]. In the

arabinan side chain, arabinosyl residues are almost entirely in the *furanose* configuration. Interestingly, rice REVERSIBLY GLYCOSYLATED PEPTIDEs (RGPs) show strong amino acid sequence identity (~80%) with an UDP-arabino*pyranose* mutase implicated in the interconversion of UDP-Ara*p* and UDP-Ara*f* [96]. Moreover, in *A. thaliana*, double knock-out mutations in two *RGPs* (*RGP1* and *RGP2*) showed a strong defect in the inner pollen wall and pollen lethality [97] suggesting that *RGP1* and *RGP2* act redundantly during pollen development. More recently, Rautengarten *et al.* [98] have shown that RGP1 and RGP2 are cytosolic and able to perform this interconversion indicating that RGPs may be part of the arabinan biosynthesis network. However, further studies are required to verify if RGP1 and RGP2 are also involved in the growth of pollen tubes. Moreover, biochemical evidence is needed to verify if the arabinan side chains of RG-I in the mutants are structurally different to the one found in wild type pollens and if other cell wall molecules containing Ara residues such as arabinogalactan proteins are not also affected.

3.1.4. Rhamnogalacturonan-II

Studies of the possible involvement of RG-II in pollen tube growth are very recent. In 2006, it was shown in tobacco that the mutation in *NpGUT1* (*Nicotiana plumbaginifolia GLUCURONOSYLTRANSFERASE1*) resulted in the inhibition of pollen tube elongation, presumably due to an abnormal deposition of RG-II and boron in the pollen tube tip cell wall [99]. However, it was shown recently that in *A. thaliana*, IRX10 (IRREGULAR XYLEM10) and IRX10-L (IRREGULAR XYLEM10-LIKE) proteins, which are closely related to *Np*GUT1, play a critical role in the synthesis of glucuronoxylan and not RG-II. [100,101]. To our knowledge, no report has shown any glucuronoxylan in the cell wall of *A. thaliana* or tobacco pollen tubes and these data contrast with the proposed function of *Np*GUT1 in the RG-II synthesis in pollen tubes.

Recently, three other genes involved in the biosynthesis of RG-II were shown to play an important role during *A. thaliana* pollen tube elongation. *KDO-8-P SYNTHASEs* (*AtKDSA1* and *AtKDSA2*) are involved in the synthesis of Kdo, one of the rare sugars composing the RG-II, with eight carbons. *Atkdsa1* and *Atkdsa2* double pollen mutants in *quartet* background are unable to form an elongated pollen tube properly and to perform fertilization [102]. In 2010, two *male gametophyte defective* (*mgp*) mutants, impaired in the biosynthesis of RG-II were isolated: *mgp4*, knock-out for a RG-II XYLOSYLTRANSFERASE [103] and *mgp2*, knock-out for a SIALYLTRANSFERASE-LIKE [104]. Both mutants display similar phenotypes with a strong inhibition of pollen germination and a delayed pollen tube growth *in vitro* and *in vivo* compared to wild type. Because the three *A. thaliana* sialyltransferase-like proteins, homologous to mammalian sialyltransferases, do not show any sialyltransferase activity *in vitro* and that the nucleotide sugar donor of the sialyltransferase CMP-Sia is similar to CMP-Kdo, Deng *et al*. [104] suggested that these genes may be involved in the RG-II biosynthesis pathway. Another contribution pointing out the critical role of RG-II in pollen tube growth was recently brought by Kobayashi *et al*. [105]. They studied the gene coding for the enzyme CTP:Kdo cytidylyltransferase (CMP:Kdo Synthetase, CKS) that activates Kdo as a nucleotide sugar during the biosynthesis of RG-II. They showed that the protein is located in the mitochondria and that this gene is essential for pollen tube development as the mutation in *CKS* induces the inhibition of pollen tube elongation [105]. All these studies indicate that RG-II is important for pollen tube growth

but none of the studies have shown biochemically that the RG-II structure in the pollen or the pollen tube was impaired. The development of specific probes targeting the different side chains of RG-II should facilitate studies on this non-abundant but important pectin motif in pollen tube growth but to date such tools are not available.

3.1.5. Pectin Methyltransferase and Pectin/XyG Acetyltransferase

The transferase activity of methyl and acetyl groups on HG was shown *in vitro* [106,107]. *QUASIMODO2* and *3* (*QUA2* and *QUA3*) are two genes coding for putative HG methyltransferases but their biochemical activities and their function during pollen tube growth have not been confirmed [108,109]. In 2011, a mutant designated as *reduced wall acetylation2* (*rwa2*) was studied. The loss-of-function in the *RWA2* gene was accompanied by a decrease of the level of acetylated cell wall polymers [110] but no phenotype was observed on the pollen tube indicating that other genes are likely to be involved in this process.

3.2. Xyloglucan Biosynthesis

Based on the structure of XyG, its biosynthesis requires a combination of (1→4)-β-glucan synthases, (1→6)-α-xylosyltransferases, (1→2)-β-galactosyltransferases, (1→2)-α-fucosyltransferases and *O*-acetyltransferases [111]. In *A. thaliana*, *CSL4* codes for a (1→4)-β-glucan synthase involved in the synthesis of the XyG backbone but transcriptomic data indicate that this gene is not expressed in pollen [112]. At least five *XYLOGLUCAN XYLOSYLTRANSFERASEs* (*XXTs*) have been identified in *A. thaliana* [76,113,114] but their implications during pollen tube growth have not been assessed yet. Two *XYLOGLUCAN GALACTOSYLTRANSFERASEs* were also characterized: *MUR3* in *A. thaliana* [115] and more recently *XLT2* in *Tropaeolum majus* [116]. However, none of these genes is expressed in pollen grains or pollen tubes [93]. *MUR1* codes for an enzyme that catalyzes the first step of the biosynthesis of GDP-fucose and the *mur1* mutants show a lack of labeling of fucosylated XyG epitopes with CCRC-M1 in hypocotyls, shoots or leaves [68]. However, the mutation does not affect the distribution of the fucosylated XyG epitopes in the pollen tube suggesting that this gene is not implicated in the XyG biosynthesis in pollen tubes. Mutation in the *FUCOSYLTRANSFERASE* gene (*FUT1*, *FT1* or *MUR2*) eliminates the fucosyl residues on the XyG side chains in all major plant organs indicating that FUT1 is involved in most of the XyG fucosyltransferase activity in *A. thaliana* [117,118]. *MUR1* and *FUT1* are not expressed in pollen grains or pollen tubes but are strongly expressed in the stigma and in ovarian tissues in *A. thaliana* [93] suggesting that XyG from the female tissues may be highly fucosylated but more direct experimental evidence is required.

3.3. Cellulose Biosynthesis

It is generally assumed that cellulose microfibrils are assembled by cellulose synthases (CESs) located at the plasma membrane in a form of rosette terminal complex. However, the possibility that the first step of cellulose biosynthesis begins in the Golgi apparatus in higher plants cannot be ruled out [119]. Different multigenic families are implicated in cellulose biosynthesis. Ten CESA (CELLULOSE SYNTHASE A) genes were found in the A. thaliana genome and it was shown by

mutant analyses that they play distinct roles in the cellulose synthesis process [120,121]. Another multigenic family, CSLD (CELLULOSE SYNTHASE LIKE-D), related to CESA, seems also to be involved in cellulose biosynthesis and contains six members in the A. thaliana genome [122,123]. In rice, the genome contains 7 CESA and 5 CSLD genes [124]. In tobacco, NaCSLD1 (Nicotiana alata *CELLULOSE SYNTHASE-LIKE D1*) was found to be only expressed in the anther and *in vitro*-grown pollen tubes and was predicted to code for a cellulose synthase in pollen [125]. In *N. tabacum* pollen tubes, CESA and CSLD were detected along the entire length of the pollen tubes with a higher concentration at the apex [126]. Similarly, in A. thaliana, CESA6, CSLD1 and CSLD4 were found at the plasma membrane of the pollen tube both at the tip and in the shank [26,127]. Moreover, crystalline cellulose was also found inside cytoplasmic vesicles and the trans Golgi network in A. thaliana pollen tubes leading to the hypothesis that the synthesis of short cellulose microfibrils may initiate in this compartment giving the pollen tubes the head start in assembling the cell wall necessary to promote rapid elongation [26]. Alternatively, the vesicles containing the cellulose may originate from endocytosis suggesting that cellulose in the shank of the tube may be degraded and recycled [26].

The CESA1 and CESA3 mutations are both gametophytic lethal. 50% of pollen grains from the heterozygous cesa1+/− or cesa3+/− plants are significantly deformed and do not produce pollen tube [128]. The cesa6 null mutants display subtle growth defect and the pollen is not deformed [128]. On the other hand, the triple cesa2/6/9 mutants are sterile and pollen grains are strongly deformed [128]. The data indicates that *CESA2* is functionally redundant with *CESA6*. As CESA9 is strongly expressed in pollen grains, these studies suggest that *CESA1*, *3*, *6* and *9* play a critical role during pollen grain formation. Recently, it was shown using pCESA6::GFP-CESA6 construction that CESA6 is expressed in pollen tubes indicating that in addition to CESA1, 3 and 9, CESA6 may also play a role during pollen tube growth [26].

Three genes from the CSLD family are also implicated in pollen tube growth. *Csld1* and *csld4* homozygous mutants are sterile. Mutant pollen grains show abnormal germination and reduce pollen tube growth *in vitro* and *in vivo*. In addition, high level of pollen tubes is bursting due to a reduced cellulose content, abnormal callose deposition and thickened and highly irregular cell wall [123,127]. Finally, mutation in CSLC6 results in a strong reduction of pollen tube growth [129]. All these data support the fact that despite the low abundance of cellulose in the cell wall of pollen tubes, it has an important function in maintaining the integrity of the tube cell.

3.4. Callose Biosynthesis

Callose is also synthesized at the plasma membrane by callose synthases (CALSs) located at the apex and the distal regions of tobacco pollen tubes. In longer pollen tubes, CALS accumulates also close to the callose plug [126]. Twelve putative *CALS* genes (*CALS1-12*) have been identified in the *A. thaliana* genome [130]. Among these 12 genes, *CALS5* is implicated in the normal deposition and patterning of the exine pollen grain [131,132] but opposite data are obtained concerning the pollen viability and the ability of the pollen tube to grow normally. *Na*GSL1 (*Nicotiana alata* GLUCAN SYNTHASE-LIKE1) was shown to be a callose synthase [133] involved in the control of callose synthesis during pollen tube growth [134]. In 2011, a study brought evidence that *CALS5* orthologues are expressed in pollen grains of many different angiosperms and gymnosperms but *CALS5* was only

expressed in fast-growing pollen tubes (*i.e.*, angiosperms), suggesting that CALS5 plays different but crucial roles during pollen formation and/or germination and pollen tube growth [55]. This study also supports the reports showing that the callose wall in slow-growing pollen tubes is generally transiently detected and the callose plug has so far not been observed in gymnosperm pollen tubes. Based on such variability and transient expression of callose in the pollen of *Pinus*, Pacini *et al*. [135] suggested that the callose may not have a structural function but rather serves as a reserve polysaccharide. In contrast, in fast growing pollen tubes like in *S. chacoense* and *Lilium orientalis*, callose was shown to have an important mechanical function [53].

4. Cell Wall Remodeling during Pollen Tube Growth

4.1. Cell Expansion: Xyloglucan-Cellulose Reassembly

4.1.1. Expansins

Expansins were first discovered in cucumber hypocotyls [136] and oat coleoptiles [137]. According to Sampedro and Cosgrove [138], expansins belong to a superfamily composed of four families: (1) EXPANSIN A (EXPA), also called α-expansin; (2) EXPANSIN B (EXPB), also known as β-expansin; (3) EXPANSIN-LIKE (EXLA); and (4) EXPANSIN-LIKE B (EXLB). α- and β-expansins are involved in cell expansion: EXPAs may promote separation of cellulose microfibrils by inducing local dissociation and slippage of XyG on the surface of the cellulose, whereas EXPBs work on different polymers, maybe xylan, with a similar effect [139]. The precise role of EXLA and EXLB has not been has not been established yet [138] and to date, no enzymatic activity has been detected for these proteins [140,141].

The *A. thaliana* genome contains 36 genes encoding putative EXPs [141,142]. Expression profile analyses of the transcripts reveal that two expansin genes one α-(*EXPA4*) and one β-(*EXPB5*) are strongly expressed in dry pollen grains, during pollen imbibition and pollen tube growth (Table 2). In addition, four other *EXPs* are strongly expressed in the stigma and one in the ovary of *A. thaliana* (Table 2). To date and to our knowledge, no study has pointed out the role of expansins in the remodeling of the pollen tube cell wall in eudicot plants. Most of the work on expansins comes from the Poales in which the development of pollen grains is accompanied by the expression of *EXPB*. In rice, several putative EXPBs were found in pollen grains by proteomics approach [143] and 4 isoforms were purified from the maize pollen [144]. During the maturation of wheat and triticale male gametophytes, a strong expression of two EXPB genes is detected but unlike the β-expansins from maize, they are not expressed in the mature pollen [145,146]. Even if the exact function of pollen EXPBs remains unanswered, Cosgrove *et al*. [147] suggested that they are released from the pollen grain on the pistil to soften the cell wall of the stigma thus facilitating the penetration and the growth of the pollen tube. Some others hypothesized that EXPBs are implicated in the formation of the exine wall during the male gametophyte formation [145].

Table 2. Expression of expansin and xyloglucan *endo*-transglucosylase hydrolase genes in pollen grains, pollen tubes and the pistil of *A. thaliana*. Data were collected from eFP Browser [148]. Proteins are named according to Magrane and the UniProt consortium [149] and according to Hende *et al*. [150] for the expansin family. Pollen grain and pollen tube data are from Qin *et al*. [93] and pistil data from Swanson *et al*. [151]. When the level of expression was <50, the data are not shown.

Cell wall metabolism	Locus	Protein name	Expression level					
			Pollen grain		Pollen tube		Pistil	
			Dry	Imbibed	4 h *in vitro*	Semi *in vivo*	stigma	ovary
Cell expansion								
CBMs	At1g20190	Expansin A11 (EXPA11)	<50	<50	<50	<50	1,614.7	421.6
	At1g26770	Expansin A10 (EXPA10)	<50	<50	<50	<50	1,893.9	641.8
	At2g28950	Expansin A6 (EXPA6)	<50	<50	<50	<50	1,919.8	1,614.2
	At2g39700	Expansin A4 (EXPA4)	4,069.6	3,962.1	3,950.8	2,106.8	321.3	429.6
	At3g45970	Expansin-like A1 (EXLA1)	<50	<50	<50	<50	1,462.7	322.1
	At3g60570	Expansin B5 (EXPB5)	1,020.2	1,139.5	1,347.1	3,002.9	53.9	52.7
Hemicellulose reassembly								
GH16	At2g06850	XTH4	<50	<50	<50	<50	129.8	1,174.4
	At4g03210	XTH9	<50	<50	<50	<50	785.1	2,518.8
	At4g30270	XTH24	<50	<50	<50	<50	146.5	1,975.7
	At5g65730	XTH6	<50	<50	<50	<50	752.1	1,013.4
	At1g32170	XTH30	1,286.7	346.2	354.2	378.6	167.2	86.2
	At4g18990	XTH29	1,02.2	95.8	91.7	<50	<50	<50

CBMs. Carbohydrate-Binding Modules, GH. Glycoside hydrolase, XTH. Xyloglucan *endo*-transglucosylase hydrolase. <50<500<1,000<2,000<3,000<5,000<10,000.

4.1.2. Xyloglucan *endo*-Transglucosylase Hydrolase

The two known activities of XyG *endo*-transglucosylase hydrolase proteins (XTHs) are XyG *endo*-transglucosylase (XET) and XyG *endo*-hydrolase (XEH) [152]. The XET activity consists of cleaving XyG polymers and joining the newly generated end to another XyG chain whereas XEH activity hydrolyzed XyG polymers [152]. XET activity was detected in extracts of the growing portions of various eudicots (including pea, lupin, tomato, sycamore, cow parsley, dandelion and bean), monocots (chive, maize, brome grass and Yorkshire fog) and Bryophytes (liverwort and moss) [153,154]. XTHs are believed to play a central role in the construction and the disassembly of the cell wall architecture [152]. XTHs are encoded by large gene families in land plants and *A. thaliana* and rice contain 33 and 29 *XTH* genes dispersed across their genomes, respectively [155,156]. Among the 33 *XTHs* in the *A. thaliana* genome, 4 are strongly expressed in flowers. Becnel *et al.* [157]

have studied the expression of the *XTH* genes using *XTH::GUS* constructions and they showed that *pXTH29::GUS* and *pXTH30::GUS* activities are clearly detected during the anther development and in the mature pollen grain [157]. In contrast, *pXTH1::GUS* and *pXTH33::GUS* activities are restricted to very young flowers. Microarray data extracted from EFP browser are consistent with these results (Table 2). Moreover, expression profiles of *XTH29* and *XTH30* appear to be pollen specific suggesting a specialized function during pollen development.

However, to date, no evidence demonstrates a role of XTHs in the pollen tube growth and cell wall remodeling. Only one *XTH* was linked to pollination. The loss of function of *AtXTH28* led to a dramatic decrease in seed setting due to the inability of the plants to self-pollinate. This phenotype was caused by a net reduction of the stamen filament length due presumably to a reduced capability of the filament cells to expand [158].

4.2. Pectin Methylesterase and Pectin/Xyloglucan Acetylesterase

HG is synthesized in the Golgi apparatus and deposited in the expanding tube tip in a highly methylesterified form [159]. The methylesterified HG in the apical zone is thought to provide sufficient plasticity for sustaining the pollen tube growth [15]. Upon block-wise action of PMEs, de-methylesterified HG polymers can form multimers via ionic bonds between the negatively charged carboxyl groups of several HG and Ca^{2+} ions forming a pectate gel that may provide rigidification of the pollen tube cell wall [12,58]. Therefore, the control of the cell wall plasticity by PMEs is critical to ensure a proper fertilization. Conversely, upon random action of PMEs, the partial removal of methylester groups may allow the pectin-degrading enzymes, polygalacturonases (PGs) or pectate lyases (PLs) (see lower section) to cleave the HG backbone thus affecting the rigidity of the cell wall [58,160]. This sequential action of PME and PG was demonstrated in the *quartet* mutants that release pollen grains as tetrads due to the persistence of pectic polysaccharides [161]. The *QUARTET1* gene encodes a PME that is required in association with the *QUARTET3* encoding a PG for the degradation of the HG of the tetrad resulting in the normal pollen separation during microsporogenesis [162,163].

The *A. thaliana* genome contains 66 putative *PMEs*. Most of the genes encoding PMEs display a tissue-specific expression pattern, especially for 14 of them that are specifically expressed in pollen grains or pollen tubes (Table 3) [93,164]. Moreover, proteomics studies of germinated pollen grains from maize, wheat, rice and *A. thaliana* have identified two putative PMEs in germinated maize pollen [165], one in rice [143] and at least one in *A. thaliana* pollen tubes [166]. In tobacco pollen tubes, biochemical analyses have shown the presence of seven isoforms with a wide isoelectric point range [167]. Two PME isoforms were co-localized with methylesterified HG in the cell wall and Golgi-derived vesicles suggesting that PMEs are transported to the tip under an inactive precursor form [167].

The first functional characterization of *PME* genes and their critical roles in pollen tube growth were obtained from two knock-out mutants *vanguard1(vgd1)* [168] and *atppme1* [169]. The disruption of *VGD1* resulted in the burst of pollen tubes *in vitro* and marked retardation of the *vgd1* pollen tube elongation in the pistil resulting in a strong reduction of male fertility and seed set [168]. The lack of AtPPME1 activity in knock-out mutants affects the shape and the growth rates of the pollen tubes, indicating that AtPPME1 is required for the integrity of the cell wall and for the tip-polarized

growth [169]. Moreover, when PME from orange peel is exogenously applied to pollen tubes of *Lilium formosanum* and tobacco or when PME is overexpressed, the pollen tube growth is inhibited [170].

Table 3. Analyses of the expression profile of pectin methylesterase and pectin and/or xyloglucan acetylesterase genes in pollen grains, pollen tubes and the pistil of *A. thaliana*. Data were collected from eFP Browser [148]. Proteins are named according to Magrane and the UniProt consortium [149]. Pollen grain and pollen tube data are from Qin *et al*. [93] and pistil data from Swanson *et al*. [151]. If the level of expression was <50 for all the selected tissues, data are not shown.

Cell wall metabolism	Locus	Protein name	Expression level					
			Pollen grain		Pollen tube		Pistil	
			Dry	Imbibed	4 h *in vitro*	Semi *in vivo*	stigma	ovary
Esterase								
CE8	At1g69940	PPME1	7,600.7	5,098.6	4,702.65	3,209.4	<50	<50
	At2g26450	PME13	4,168.8	4,391.9	4,361.9	4,954.5	<50	<50
	At2g47030	PME4/VGDH1	9,592.1	7,074.2	6,539.6	7,813.1	164.1	<50
	At2g47040	PME5/VGD1	9,592.2	7,074.3	6,539.6	7,813.1	164.1	<50
	At3g05610	PME21	7,557.3	4,778.3	4,618.9	5,347.8	<50	<50
	At3g06830	PME23	4,485.1	1,952.0	1,593.5	73.6	<50	<50
	At3g14310	PME3	<50	<50	<50	<50	284.2	1,047.5
	At3g17060	PME67	4,796.4	4,707.4	4,826.6	4,838.3	<50	<50
	At3g49220	PME34	<50	<50	<50	<50	1,370.3	1,408.2
	At3g62170	PME37	6,829.9	5,434.6	5,566.4	868.0	<50	<50
	At4g15980	PME43	1,930.8	905.9	592.5	<50	<50	51.5
	At4g33230	PME45	759.8	904.1	917.7	92.9	<50	<50
	At5g07410	PME48	7,600.8	5,098.7	4,702.65	3,209.4	<50	<50
	At5g07420	PME49	3,519.5	3,605.9	3,144.6	132.4	<50	<50
	At5g07430	PME50	8,606.5	7,181.6	7,258.6	7,198.7	90.3	<50
	At5g27870	PME28	2,859.6	2,817.7	2,537.8	66.6	<50	<50
	At5g47500	PME68	<50	<50	<50	<50	687.9	1,308.9
	At5g49180	PME58	<50	<50	<50	1,361.1	446.2	1,175.3
CE12	At4g19410	Putative PAE	<50	<50	<50	<50	438.9	1,095.7

CE. Carbohydrate Esterases, PAE. Pectin AcetylEsterase, PME. Pectin MethylEsterase, PPME. Pollen Pectin MethylEsterase, VGD. Vanguard, VGDH. Vanguard Homolog. <50<500<1,000<2,000<3,000<5,000<10,000.

The main regulators of PMEs are PME inhibitors (PMEIs). Sequence analyses indicate that several PMEs contain, in addition to the catalytic domain, an *N*-terminal extension domain (the PRO region) showing similarity with PMEI domains [58]. Based on this, PMEs are classified in two distinct groups depending on the presence or absence of this putative PMEI domain. Group 1 PMEs do not have the PRO region, whereas PMEs from group 2 can contain from 1 to 3 PMEI domains [169]. It is hypothesized that the PRO region is cleaved during the maturation of PME, as so far, only PMEs lacking this domain were found in the cell wall [58].

Recently, Wolf *et al.* [164] indicated that the PRO region of the group 2 PMEs might regulate the release of the mature PMEs from the Golgi apparatus. It was also suggested that the PRO region might play an auto-inhibitory role during maturation [170]. PMEIs are not only found in the PRO region of

PMEs but also exist as individual proteins sharing strong sequence similarities with invertase inhibitors (Inv inhibitors). However, there is no clear evidence of a similar function and mode of action between PMEIs/Inv inhibitors and PMEI domains of PMEs. The *A. thaliana* genome contains 76 genes coding highly putative PMEIs/Inv inhibitors. The expression patterns of *PMEIs/Inv inhibitors* are all regulated in a tissue-specific manner [171,172] and transcriptomic data reveal that *PMEIs/Inv inhibitors* are highly expressed in the *A. thaliana* pollen compared to other tissues [171,173]. As 9 out of the 14 *PMEs* specifically expressed in pollens are from the group 2 (with PMEI domains), it may suggest that PMEIs play a crucial role in regulating the activity of PMEs during pollen germination and pollen tube growth. Suppression of the expression of At1g10770 (coding for a putative PMEI) leads to a partial male sterility reducing the seed set by inhibition of pollen tube growth [174]. Moreover, treatments of pollen tubes with exogeneous PMEI also result in an abnormal germination and burst of pollen tubes in *A. thaliana* [175]. Finally, it was shown that AtPPME1 and AtPMEI2, both pollen specific, physically interact and *in vitro* assays revealed that AtPMEI2 was able to inactivate AtPPME1 [176]. The transient expression of AtPPME1 and AtPMEI2 in tobacco pollen tubes demonstrated that AtPPME1 accumulates uniformly from the tip to the shank of the pollen tube. In contrast, the localization of AtPMEI2 is restricted to the tip and in endosomal vesicles suggesting its internalization and recycling [176]. PMEs are thought to play an important role during the tip-polarized growth of the pollen tube by controlling the mechanistic properties of the cell wall. However, the function of PMEs is probably not restricted to the change of the mechanical properties of the cell wall. Weakly methylesterified HG have been implicated in other important physiological processes such as cell attachment in vegetative cells or organs [92,177,178] and in lily, associated with a stigma/style cysteine-rich adhesin (SCA), a secreted plant lipid transfer protein (LTP), in pollen tube adhesion [179,180]. Several *LTPs* are expressed in the transmitting tract of the *A. thaliana* pistil along the pollen tube path [181] that may be involved in this process. In tobacco, it was shown that TobLTP2 purified from the stigma exudates accumulate in the pistil and are able, as expansins do, to promote cell wall loosening. However, the pollen tube growth in LTP-silenced plants is similar to wild type plants, suggesting either that pollen tubes do not require this loosening protein or that other loosening agents may have act redundantly [182]. Recently, LTP5, produced in *A. thaliana* pollen tubes and in the transmitting tract, was proposed to play important roles in maintaining the cell polarity at the tube tip and adhesion-mediated guidance perhaps by interactions with pectins [183]. Direct evidence is lacking, but it appears highly probable that PMEs, by modifying the degree of methylesterification of HG, play a direct role in adhesion and guidance of the pollen tube.

Finally, one putative pectin acetylesterase was detected in rice pollen [143] and a recent report has shown that the overexpression of the *Populus PECTIN-ACETYLESTERASE1* in tobacco affected the shape of the pollen grains and their abilities to germinate [184].

4.3. Pectin lyase

PL (PECTIN LYASE) and PLL (PECTIN LYASE-LIKE) genes are also abundantly expressed in tomato, tobacco, alfalfa and arabidopsis pollen [185–187] and several pollen allergens have PLL activities [188]. Out of the 26 *PLL* genes, 14 are expressed in pollen [189]. None of these 14 genes is specifically dedicated to the male gametophyte but 4 of them are strongly expressed in pollen grains

(Table 4). To our knowledge, there is no experimental evidence of the implication of *PLL* in the remodeling of the pollen tube wall. Many promoter activities of the *PLLs* genes are similar to those exhibited by many *POLYGALACTURONASEs* (*PGs*) [190]. This may imply a close functional association between PLLs and PGs, particularly in the digestion of the pollen grain cell wall prior to germination and during pollen tube growth [190,191].

Table 4. Analyses of the expression profile of *PECTATE LYASEs* in pollen grains, pollen tubes and in the pistil of *A. thaliana*. Data were collected from eFP Browser [148]. Proteins are named according to Magrane and the UniProt consortium [149]. Pollen grain and pollen tube data are from Qin *et al*. [93] and the pistil data from Swanson *et al*. [151]. If the level of expression was <50 for all the selected tissues, data are not shown.

Cell wall metabolism	Locus	Protein name	Expression level					
			Pollen grain		Pollen tube		Pistil	
			Dry	Imbibed	4 h *in vitro*	Semi *in vivo*	stigma	ovary
Lyase								
PL1	At1g04680	Probable pectate lyase 1	<50	<50	<50	<50	681.0	1,457.2
	At1g14420	Probable pectate lyase 3	3,922.2	3,514.5	3,591.2	1,171.3	<50	<50
	At2g02720	Probable pectate lyase 6	3,608.0	3,599.7	3,533.1	4,007.9	<50	<50
	At3g01270	Probable pectate lyase 7	6,694.0	6,572.3	6,546.1	7,161.1	166.1	112.7
	At4g24780	Probable pectate lyase 18	<50	<50	<50	<50	1,969.1	1,173.3
	At5g09280	Major pollen allergen like protein	<50	<50	<50	3,192.1	<50	<50
	At5g15110	Probable pectate lyase 18	3,865.4	3,782.2	3,390.4	625.1	<50	<50

PL. Pectin Lyase. <50<500<1,000<2,000<3,000<5,000<10,000.

4.4. Glycoside Hydrolases

Glycoside hydrolases (GHs) are enzymes that catalyze the hydrolysis of glycosidic linkages between two or more glycosides or between a carbohydrate and a non-carbohydrate moiety. In 1991, GHs were classified into 35 families [192] and to date they are divided into over 100 families [193]. GHs involved in the reassembly of the pollen tube cell wall belong to the GH3, 9, 10, 17, 28, 35, 43 and 51 families. Their activities as well as their possible functions during pollen tube growth are presented in Table 5.

Table 5. Summary of the main glycoside hydrolase (GH) families possibly involved in the remodeling of the pollen tube cell wall.

Family	Known activities	Possible function during pollen tube growth
GH3	β-D-xylosidase (EC 3.2.1.37) α-L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) β-glucosidase (EC 3.2.1.21)	Degradation of xylan/arabinoxylan Degradation of RG-I, arabinogalactan proteins.
GH9	*Endo*-(1→4)-β-glucanase (EC 3.2.1.4) Cellobiohydrolase (EC 3.2.1.91) β-glucosidase (EC 3.2.1.21)	Degradation of cellulose and XyG backbone May control the diameter of the pollen tube. May help to digest the cell wall of the stigma to facilitate the pollen tube penetration in the female tissues.
GH10	*Endo*-(1→4)-β-xylanase (EC 3.2.1.8)	Degradation of xylan
GH17	*Endo*-Glucan (1→3)-β-glucosidase (EC 3.2.1.39) Glucan (1→3)-β-glucosidase (EC 3.2.1.58) *Endo*-(1→3-1→4)-β-glucanase (EC 3.2.1.73) β-(1→3)-glucanosyltransglycosylase (EC 2.4.1.)	Degradation of callose or β-mixed-(1→3, 1→4) glucans. May promote pollen germination and control the mechanical properties of the pollen tube cell wall during elongation.
GH28	Polygalacturonase (EC 3.2.1.15) *Exo*-polygalacturonase (EC 3.2.1.67) *Exo*-polygalacturonosidase (EC 3.2.1.82) Rhamnogalacturonase (EC 3.2.1.171) Rhamnogalacturonan α-L-rhamnopyranohydrolase (EC 3.2.1.40) *Endo*-xylogalacturonan hydrolase (EC 3.2.1.-)	Degradation of weakly esterified HG: cell wall loosening. May control the stiffness of the tube during elongation and/or help to digest the cell wall of the stigma thus facilitating the penetration of the tube. Degradation of RG-I backbone Degradation of xylogalacturonan
GH31	α-xylosidase (EC 3.2.1.177)	Degradation of XyG or RG-II side chains
GH35	β-galactosidase (EC 3.2.1.23) *Exo*-β-(1→4)-galactanase (EC 3.2.1.-)	Degradation of RG-I, XyG and/or arabinogalactan proteins. Turn over of pollen tube cell wall. Pollen tube guidance
GH43	β-D-xylosidase (EC 3.2.1.37) α-L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55)	Degradation of xylan/arabinoxylan Degradation of RG-I, arabinogalactan proteins, arabinoxylan.
GH51	α-L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55)	Degradation of RG-I, arabinogalactan proteins, arabinoxylan.

Endo-(1→4)-β-glucanases and *endo*-(1→3)-β-glucosidases are members of the GH9 and GH17 families, respectively (Tables 5 and 6). In *A. thaliana*, 25 genes are encoding GH9 proteins and 49 the GH17 proteins. Among the 25 putative *CELLULASES*, two are strongly expressed in pollen grains and three in *in vitro*-grown pollen tubes (Table 6). Four members of the GH17 family are expressed in *in vitro*-grown pollen tubes (Table 6). Three and five genes encoding the GH9 and GH17 are also found in the pistil tissues, respectively. Twenty years ago, these two enzyme activities were assayed in pistils and anthers of bean and they were linked to the cell wall disruption occurring during the release of the pollen grain from the anther and during the penetration of the pollen tube through the stigma [194].

Recently, and despite its low abundance in the pollen tube cell wall, it was shown that cellulose plays a crucial role by influencing the diameter of *in vitro*-grown pollen tubes [195]. As described previously, the cell wall of fast-growing pollen tubes is enriched in callose and several studies have shown that moderate β-(1→3)-glucanase treatments are able to stimulate the germination of pollen grains [53,196]. Moreover, it was reported that *exo*-β-glucanases might play an important role in the regulation of pollen tube elongation in lily [197]. On the contrary, treatments with inhibitors of glucosidases severely inhibited the growth of pollen tubes [198]. It was hypothesized that the mechanical properties of callose and more precisely the resistance to lateral deformation of the tube was regulated by glucanases [53] (Table 5).

Table 6. Analyses of the expression profile of glycoside hydrolase (*GHs*) genes in pollen grains, pollen tubes and in the pistil of *A. thaliana*. Data were collected from eFP Browser [148]. Proteins are named according to Magrane and the UniProt consortium [149] and to Hruba *et al*. [199] for the GH3 family. Pollen grain and pollen tube data are from Qin *et al*. [93] and the pistil data from Swanson *et al*. [151]. If the level of expression was <50 for all the selected tissues, data are not shown.

Cell wall metabolism	Locus	Protein name	Expression level					
			Pollen grain		Pollen tube		Pistil	
			Dry	Imbibed	4 h *in vitro*	Semi *in vivo*	stigma	ovary
Glycoside Hydrolases								
GH3	At1g02640	β-D-xylosidase	<50	<50	<50	<50	66.1	227.3
	At1g78060	β-D-xylosidase	<50	<50	<50	<50	149.2	401.8
	At3g19620	β-D-xylosidase	<50	<50	<50	<50	388.6	76.9
	At3g47000	β-D-xylosidase	<50	<50	<50	<50	190.2	330.6
	At3g62710	β-D-xylosidase	4,780.4	4,342.3	4,813.6	6,223.6	73	51.7
	At5g09730	β-D-xylosidase 3/α-L-Arabinofuranosidase	<50	<50	<50	<50	803.5	2,807.8
	At5g10560	β-D-xylosidase	<50	<50	<50	<50	191.5	508.8
	At5g20940	β-D-xylosidase	<50	<50	<50	<50	<50	62.9
	At5g20950	β-D-xylosidase	<50	<50	<50	<50	741.4	1,468.4
	At5g49360	β-D-xylosidase 1/α-L-Arabinofuranosidase	<50	<50	<50	<50	193.9	921.4
	At5g64570	β-D-xylosidase	<50	<50	<50	<50	324.3	1,586.8
GH9	At1g70710	Endo-(1→4)-β-glucanase (CEL1)	<50	<50	<50	<50	732.8	1,921.9
	At1g71380	Endo-(1→4)-β-glucanase (CEL3)	<50	71.0	665.4	2,823.2	<50	57.8
	At2g44560	Endo-(1→4)-β-glucanase	2,345.4	2,152.9	2,492.6	1,224.1	<50	<50
	At3g43860	Endo-(1→4)-β-glucanase	5,932.2	5,925.4	5,738.7	3,735.4	<50	<50
GH9	At4g02290	Endo-(1→4)-β-glucanase (CEL4)	<50	<50	<50	<50	<50	1,223.5
	At5g49720	Endo-(1→4)-β-glucanase (RSW2/KOR1)	<50	<50	<50	<50	822.2	1,027.5

Table 6. *Cont.*

Cell wall metabolism	Locus	Protein name	Expression level					
			Pollen grain		Pollen tube		Pistil	
			Dry	Imbibed	4 h *in vitro*	Semi *in vivo*	stigma	ovary
GH10	At4g33850	GH 10 protein	1,571.9	1,369.8	1,495.2	205.7	<50	<50
	At4g33860	Endo-(1→4)-β xylanase, putative	1,571.9	1,369.8	1,495.2	205.7	<50	<50
GH17	At2g05790	Putative β-(1→3)-glucanase	<50	<50	<50	<50	1,054.1	2,723.2
	At3g07320	Putative β-(1→3)-glucanase	<50	<50	<50	<50	482.9	1,241.9
	At3g55430	Putative β-(1→3)-glucanase	3,815.6	3,499.7	3,184.8	1,146.9	504.2	824.6
	At4g26830	Putative β-(1→3)-glucanase	<50	<50	221.1	3,284.7	<50	<50
	At5g20390	Putative β-(1→3)-glucanase	3,190.6	3,251.1	3,427.8	365	<50	<50
	At5g42100	Glucan endo-(1→3)-β-glucosidase 10	<50	<50	<50	<50	726.5	1,402.3
	At5g55180	β-(1→3)-glucanase like	<50	<50	<50	<50	258.2	1,247.9
	At5g64790	β-(1→3)-glucanase	2,007.8	1,991.2	1,972.5	1,439.2	<50	<50
GH28	At1g02790	Exopolygalacturonase (PGA4)	6,048.4	5,842.1	5,885.1	5,376.4	137.3	82.5
	At2g23900	Putative polygalacturonase	3,341.6	3,090.6	3,228.7	2,308.4	<50	<50
	At3g07820	Polygalacturonase (PGA3)	6,791.1	7,077.4	6,983.5	7,731.2	137.5	63.1
	At3g07850	Exopolygalacturonase	7,694.0	7,415.6	7,187.2	3,814.6	<50	<50
	At3g14040	Exopolygalacturonase	7,694.0	7,415.6	7,187.2	3,814.6	<50	<50
	At4g23820	Putative polygalacturonase	<50	<50	<50	<50	726.1	1,214.5
	At5g48140	Putative polygalacturonase	5,423.3	5,327.8	5,417.7	5,266.6	<50	<50
GH31	At1g68560	α-xylosidase (XYL1)	<50	<50	<50	<50	500.4	765.4
	At3g45940	α-xylosidase (XYL2)	<50	<50	<50	<50	101.3	171.9
GH35	At2g16730	β-galactosidase (BGAL13)	3,753.9	3,752.6	3,219.2	550.5	<50	<50
	At2g28470	β-galactosidase (BGAL8)	<50	<50	<50	<50	2,437.4	2,075.1
	At4g35010	β-galactosidase (BGAL11)	4,248.3	4,056.9	4,264.4	5,783.1	77.7	<50
	At4g36360	β-galactosidase (BGAL3)	<50	<50	<50	<50	598.5	1,462.5
GH43	At3g49880	β-xylosidase	<50	<50	<50	<50	77.8	134.7
GH51	At3g10740	α-L-Arabinofuranosidase	<50	<50	<50	<50	184.9	402.8

GH. Glycoside Hydrolases, CEL. Cellulase, RSW.Radially Swollen, KOR. Korrigan, PGA. Polygalacturonase, BGAL. β-galactosidase, XYL. xylosidase. 50<500<1,000<2,000<3,000<5,000<10,000.

Polygalacturonases (PGs) are involved in the HG degradation. They were characterized in the pollen from corn and other Poales [200] and have since been identified in various plants including rice, pea, tomato and arabidopsis [143,190,201,202]. PGs belong to the GH28 family composed of 69 genes in *A. thaliana* [203,204]. In 2000, Torki *et al*. [205] showed that 7 *PG* genes were strongly expressed in *A. thaliana* flowers. Publicly available microarray data are consistent with this result as 6 *PG* genes are strongly expressed in pollen tubes and one is expressed in the pistil (Table 6). Together with the strong expression of more than 10 *PMEs* and 4 *PLLs* in pollen tubes, these data suggest an important remodeling of the HG during pollen tube growth. PGs are involved, during pollen maturation of *Brassica campestris*, in the intine and/or exine formations [206,207] and in *Turnera subulata*, PGs are implicated in self-incompatibility [208]. PGs are released upon rehydration of triticale pollen grains [146] and are also detected in the tip region of pollen tubes in *Brassica napus* during papillar cell penetration [209] suggesting that PGs are probably involved in the loosening of the stigma cell wall during pollination. As PGs degrade weakly methylesterified HG and that the demethylesterification of methylesterified HG by PMEs at the tip of the tube is accompanied by the release of protons, it was suggested that this local change of pH in the pollen tube cell wall may promote PG activity [58,210]. This activation of PGs might then control the loosening of the pollen tube cell wall back from the tip and then promote the proper pulse growth of the tube (Table 5). Alternatively, pollen tube PGs may also affect the loosening of the stigma and transmitting tract cell wall to facilitate the penetration of the pollen tube (Table 5).

β-galactosidases (BGALs) belong to the GH35 family. BGALs can act on different substrates including arabinogalactan proteins, galactolipids, RG-I and RG-II side chains of pectin and XyG releasing galactose [211]. Eighteen genes are encoding BGALs in the *A. thaliana* genome and the functional genomics analysis reveals that *BGAL* expression levels are high in mature leaf, root, flower and silique but are low in young seedling [212]. Publicly available microarray data (Table 6) show that 2 *BGALs* are highly expressed in mature pollen grains and 2 others are highly expressed in the pistil confirming the results obtained by Ahn *et al*. [212]. Other *BGAL* genes are also strongly expressed during the microspore mitosis in developing pollen grains [199]. In rice, 35 genes are encoding BGALs; among them, two are strongly expressed in dry pollen grains [213] (Table 6). As mutants defective in BGAL have impaired fertility, it was hypothesized that BGAL may be involved in the pollen tube wall turnover in *Brassica campestris* by hydrolyzing arabinogalactan [214]. In 1995, it was suggested in tobacco that BGALs could be secreted from the pollen tube and released in the stylar transmitting tract to modify the branching pattern of arabinogalactan involved in the guidance of pollen tubes [215,216]. In tobacco, *BGAL* mRNAs are accumulated during the formation of pollen grains, presumably stored for future use during pollen germination and pollen tube growth as BGAL activities were detected in growing pollen tubes [217]. In rice, 6 isoforms of putative BGALs were detected by proteomic [143]. Finally, it was also suggested that BGALs might also be required for PME activity [218,219]. Transcriptomic data showed very strong pollen specific expression profile of one β-xylosidase gene in mature dry pollen grains [199], and in *in vitro* and semi-*in vivo* grown pollen tubes. The exact substrate of this enzyme is not known but it may degrade several cell wall polymers such as xylan, xylogalacturonan and possibly *N*-linked glycoproteins. All the other putative xylosidases (12 genes that belong to the families GH3 and GH31) are only expressed in the pistil (Table 6). In addition, transcriptomic data do not show a strong expression of arabinofuranosidase

genes in the pollen (Table 6). This is somehow surprising considering that Ara is one of the main carbohydrates present in the cell wall of *A. thaliana* pollen tubes [25]. It may suggest that the Ara containing polymers are not remodeled and/or that arabinofuranosidases originate from the female tissues (Table 6). The pattern of expression of α-xylosidase genes (GH31) is close to the one found for the arabinofuranosidase genes. α-xylosidase genes are not strongly expressed in dry pollen grains or pollen tubes. However, two α-xylosidase genes are expressed in the pistil (Table 6). Analyses of the *A. thaliana Atxyl1* mutants show reduced α-xylosidase activity, altered XyG composition and shorter siliques compared to the wild type. Moreover *pAtxyl1::GUS* expression is strong in the style [220]. It suggests that AtXYL1 may remodel the XyG of pollen tubes. However, it is difficult to directly implicate this α-xylosidase activity in pollen tube growth as seed production was apparently not affected.

By comparing the proteome of rice pollen grains and pollen tubes, Dai *et al*. [191] showed that several proteins involved in the cell wall biosynthesis and remodeling are either up- or down-regulated. Several RGP, PME, PG and EXPB isoforms are up-regulated upon pollen germination whereas others PGs, xylanases and EXPBs are down-regulated indicating that several proteins are dedicated to pollen germination and others to pollen tube growth. The authors suggested that the down-regulated proteins in the pollen tube may result from their release into the culture medium. In the *in vivo* context, the release of these proteins in the pistil tissues may facilitate the pollen tube growth. Finally, glycosylated and/or phosphorylated proteins were detected and contributed to the generation of new isoforms [191]. The activity of enzymes is commonly regulated by phosphorylation, glycosylation and/or interaction with specific inhibitors but more studies are required to assess the fine tuning and the exact function of these posttranslational modifications in pollen tube growth [191].

5. Mechanical Properties of the Cell Wall Network during Pollen Tube Growth

In recent years, A. Geitmann's lab has studied the mechanical properties of pollen tubes using micro-indentation and finite element technique [63]. In *A. thaliana*, lily and *S. chacoense*, it is observed that the tip region is elastic and the shank of the tube is rigid [26,53]. The modification of the cell wall mechanical properties using exogenous and moderate pectinase concentrations promotes pollen tube growth and the overall stiffness of the pollen tube decreased in both the apical and distal regions [53] suggesting that pectins are important components in respect to the cell wall mechanics [63]. As expected, an increase of the pectinase concentrations results at first by in apical swelling and ultimately bursting of the pollen tube. By contrast, PME treatments of pollen tubes increase the cellular stiffness at the apex and reduce the visco-elasticity. It reveals that the gradient from methylesterified (in the hemisphere-shape tip) to de-methylesterified (in the cylindrical shank) HG increases the cell wall rigidity [30] by promoting calcium cross-links with the negatively charged carboxylic groups of HG. This was also observed by Rounds *et al*. [45] using PI on pollen tubes treated with PME. A dramatic increase of the PI fluorescence at the apex of treated pollen tubes was detected due to an increase of demethylesterified HG. The authors suggested that PI interacted with demethylesterified HG by competing with calcium.

Despite its low abundance, cellulose plays an important role in stabilizing the pollen tube tip wall especially in the transition zone between the tip and the shank [13]. Cellulose microfibrils display an oblique orientation along the pollen tube wall in *Pinus* [27] whereas a more longitudinal orientation is

observed in *Lilium*, *S. chacoense* and *A. thaliana* suggesting that cellulose microfibrils are not the main stress bearing component against turgor pressure [26,195,221]. However, cellulose is of main importance in the mechanical stabilization of the tip region. Cellulase treatments or inhibition of cellulose crystal formation with drugs resulted in larger pollen tube diameters and promoted tip swelling and eventually bursting [195] as observed with the *cellulose synthase* mutants. Similar phenotypes were observed on *Petunia* and lily pollen tubes treated with 2,6-dichlorobenzonitrile (DCB), a cellulose biosynthesis inhibitor [222] or on conifer pollen tubes treated with isoxaben [56]. Recently, Derksen *et al*. [54] have shown that the cell wall structure of tobacco pollen tubes is organized both at the tip and back from the tip of 40–50 nm spaced lattice of continuous fibers that will allow intake of substantial size molecules from the surroundings.

In planta, XyGs are known to interact by hydrogen bounding with cellulose microfibrils but no information is available in pollen tubes. *O*-acetyl groups and the fucose residues of XyG do not seem to play a major role in the interaction with cellulose. *In vitro* experiments have shown that acetylated or de-acetylated XyG can cross-link similarly cellulose microfibrils [223]. In contrast, the presence of galactosyl residues appeared to be important in promoting the interaction with cellulose. XyG lacking Gal residues self-associated and did not interacted with cellulose [223]. Moreover, *A. thaliana* mutants with XyG lacking xylosyl and galactosyl residues showed a reduction of the tensile strength [224] and abnormal bulging in root hairs, possibly due to impaired cellulose-XyG assembly [225,226]. All together, these data suggests that the high levels of fucosylation and *O*-acetylation in the *A. thaliana* pollen tube XyG and perhaps in other species may prevent a strong interaction with cellulose microfibrils at the tip, promoting the fast growth of the pollen tube. Moreover, the high level of *O*-acetylation in XyG pollen tubes may also modulate the interaction between cell wall polymers and/or hinder enzymatic degradation [227] perhaps from enzymes originating from the pistil. Very recently, in root hairs of *A. thaliana*, a new branching pattern of XyG was characterized with GalA residues instead of Gal [228]. This motif was not detected in *A. thaliana* pollen tubes but it indicates clearly that tip-polarized cells can have specific XyG compositions to modulate the interaction with cellulose microfibrils and promote fast growth.

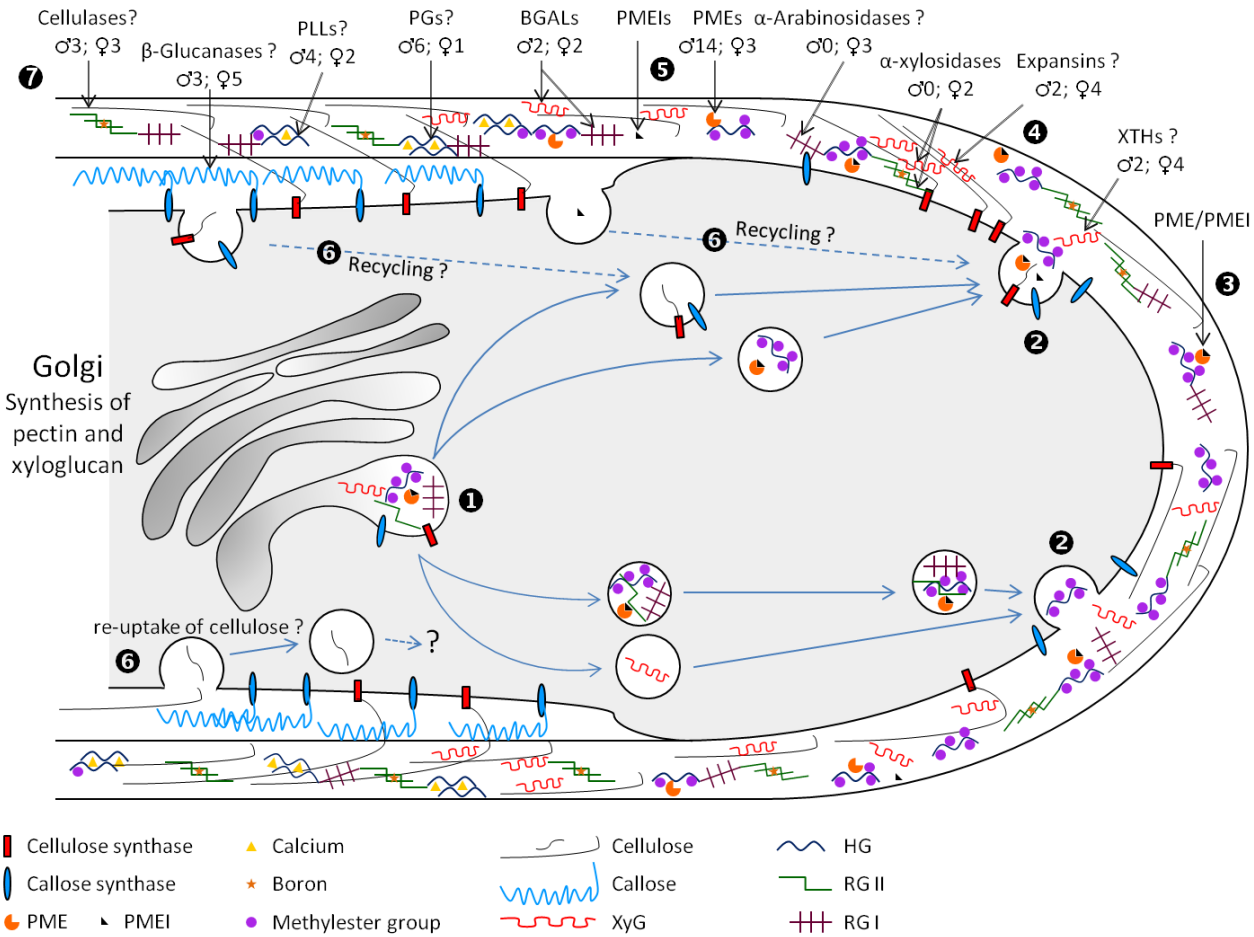
The amorphous callose is also important in the mechanical properties of the pollen tube cell wall. Treatments of pollen tubes with lyticase, an enzyme able to degrade callose, increase the diameter of the pollen tube, reduce the cellular stiffness and increase the cellular viscoelasticity in the distal part of *S. chacoense* pollen tubes suggesting that the callose wall may function in resistance to compression and/or tension stresses [53]. Using a combination of PME, pectinase and lyticase on fixed pollen tubes, Chebli *et al*. [26] suggested that cellulose and pectin are closely linked in the tip region of *A. thaliana* pollen tubes as demonstrated in the *A. thaliana* primary cell wall [229] and in the shank of the tube, a tight network of cellulose and callose is formed. Recently, using cellular force microscopy on lily pollen tubes, Vogler *et al*. [230] revealed also that the apparent stiffness of the pollen tube was lower at the tip than in the shank. However, they suggested that these differences are not originating from the distribution of the cell wall polymers or the thickness of the cell wall but solely due to the geometry of the pollen tube.

6. Conclusions

Over the last 25 years, the use of *in vitro* systems has been very valuable and a lot of information was collected concerning the distribution of the cell wall polymers in many species, but mostly focused on HG, callose, cellulose and arabinogalactan-proteins. In *A. thaliana*, functional genomics approaches have allowed the characterization of several genes implicated in the biosynthesis of pollen tube cell wall polysaccharides (mostly callose and cellulose). However, considering the large number of genes necessary to synthesize pectin, very few of them have been functionally characterized (several in the RG-II biosynthesis) and so far, none involved in the synthesis of XyG. Similarly, very few pollen genes involved in the remodeling of the pollen tube cell wall have been experimentally characterized. In addition, in the *in vitro* studies of pollen mutants, it is sometimes difficult to compare the data due to the use of different culture media and conditions, which may enhance or reduce the observed phenotypes. In many cases, a mutation completely inhibits pollen germination thus preventing the investigation of functional studies during pollen tube growth. Moreover, very little information is available on "non model" pollen tube species especially in gymnosperms and monocots. However, in recent years, the number of sequenced genomes from evolutionary divergent species has increased and will probably provide important information in the search of orthologous genes as it was done with *CALLOSE SYNTHASE5*. The development of new probes targeting the cell wall components and the improvement of the technology have also allowed more detailed studies on the cell wall biochemistry and the mechanic of the pollen tube cell wall. Finally, to increase the complexity of the system during their journey pollen tubes travel in the female tissues where additional cell wall interactions, cross-linking, modification, degradation and recycling can occur (Figure 4). The challenge will be to integrate all the parameters from protein signaling and trafficking to cell wall deposition and remodeling in the *in vivo* context in response to extracellular cues. Solving this complex network of information will unravel the secret of pollen tube tip expansion and guidance.

Figure 4. Model presenting the deposition of the main polysaccharides composing the pollen tube cell wall and its possible remodeling with proteins originating from the pollen tube or the pistil. (❶) Callose and cellulose synthases as well as XyG and pectin (HG, RG-I and RG-II) are carried within Golgi-derived vesicles. HG is synthesized in a highly methylesterified form and may or not be transported together with PME/PMEI complexes. (❷) The vesicles are directed to the plasma membrane in the sub-apical zone of the pollen tube tip where they fuse and release their contents (polysaccharides and/or remodeling proteins) in the cell wall. XyG is released under its final fucosylated form. Callose and cellulose synthases stay embedded in the membrane whereas PME/PMEI complexes and the other cell wall remodeling enzymes are released in the apoplast (❸). (❹) XyG and cellulose microfibrils probably interact loosely in the pollen tube tip and/or XTHs and expansins may facilitate the loosening process. It is not known if the RG-II borate dimer is synthesized in the Golgi and secreted under its final form or formed in the cell wall with exogenous boron coming from the culture medium or the pistil. (❺) PMEs are activated after their separations from PMEIs. PMEs are demethylesterifying the HG that promote the fixation of calcium ions between several parallel HG chains, thus reinforcing the cell wall

rigidity. PMEs are hypothesized to remain in the apoplast in the shank of the pollen tube. PMEIs may be degraded by proteases or recycled by endocytosis (❻). Similarly, it is hypothesized that the excess of cellulose and callose synthases may eventually be recycled by endocytosis. Similarly, cellulose microfibrils may also be endocytosed suggesting the action of cellulases. (❼) Comparable process might be observed with the degradation of callose with β-glucanases. The main class of enzymes (cellulases, β-glucanases, PLLs, PGs, PMEs, BGALs, α-xylosidases and α-arabinosidases, expansins and XTHs) possibly implicated in the remodeling and/or degradation of the pollen tube cell wall are presented. Numbers below the proteins correspond to the number of genes highly expressed in the pistil (♀) and the pollen tube (♂) of *A. thaliana*. BGALs, β-galactosidases; PGs, polygalacturonases; PLLs, pectate lyases-like; PMEs, pectin methylesterases; PMEIs, pectin methylesterase inhibitors; RG-I, rhamnogalacturonan-I; RG-II, rhamnogalacturonan-II; XTHs, xyloglucan *endo*-transglucosylase hydrolases; XyG, xyloglucan. Objects are not drawn to scale.



Acknowledgments

Very special thanks are due to E.M. Lord (UC Riverside) for having passionately launched JCM onto the fascinating field of pollen tube biology and plant reproduction. JCM is also grateful to all the students who have worked on pollen tubes and our colleagues for the interesting discussions during our

lab meetings. The authors wish to thank John Moore (Stellenbosch University, South Africa) and the four anonymous reviewers for their comments and suggestions for improving the quality of the manuscript. This work was partly supported by the University of Rouen and the research network VASI (Plant, Agronomy, Soils and Innovations) of the region Haute-Normandie, France. The authors are grateful to VASI for supporting FD during his PhD and the research network IRIB (Institute for Research and Innovation in Biomedicine) of the region Haute-Normandie, France for the doctoral fellowship to CL.

References

1. Lord, E.M.; Russell, S.D. The mechanisms of pollination and fertilization in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2002**, *18*, 81–105.
2. Kandasamy, M.K.; Nasrallah, J.B.; Nasrallah, M.E. Pollen-pistil interactions and developmental regulation of pollen tube growth in *Arabidopsis*. *Development* **1994**, *120*, 3405–3418.
3. Lennon, K.A.; Roy, S.; Hepler, P.K.; Lord, E.M. The structure of the transmitting tissue of *Arabidopsis thaliana* (L.) and the path of pollen tube growth. *Sex. Plant Reprod.* **1998**, *11*, 49–59.
4. Palanivelu, R.; Preuss, D. Pollen tube targeting and axon guidance: Parallels in tip growth mechanisms. *Trends Cell Biol.* **2000**, *10*, 517–524.
5. Kim, S.; Mollet, J.C.; Dong, J.; Zhang, K.; Park, S.Y.; Lord, E.M. Chemocyanin, a small basic protein from the lily stigma, induces pollen tube chemotropism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 16125–16130.
6. McCormick, S.; Yang, H. Is there more than one way to attract a pollen tube? *Trends Plant Sci.* **2005**, *10*, 260–263.
7. Boavida, L.C.; Vieira, A.M.; Becker, J.D.; Feijò, J.A. Gametophyte interaction and sexual reproduction: How plants make a zygote. *Int. J. Dev. Biol.* **2005**, *49*, 615–632.
8. Johnson, M.A.; Lord, E.M. Extracellular guidance cues and intracellular signaling pathways that direct pollen tube growth. In *The Pollen Tube: A Cellular and Molecular Perspective*; Malho, R., Ed.; Springer: Berlin, Germany, 2006; Volume 3, pp. 223–242.
9. Mollet, J.C.; Faugeron, C.; Morvan, H. Cell adhesion, separation and guidance in compatible plant reproduction. *Annu. Plant Rev.* **2007**, *25*, 69–90.
10. Wang, H.J.; Huang, J.C.; Jauh, G.Y. Pollen germination and tube growth. *Adv. Bot. Res.* **2010**, *54*, 1–52.
11. Boisson-Dernier, A.; Kessler, S.A.; Grossniklaus, U. The walls have ears: The role of plant CrRLK1Ls in sensing and transducing extracellular signals. *J. Exp. Bot*. **2011**, *62*, 1581–1591.
12. Geitmann, A.; Steer, M. The Architecture and properties of the pollen tube cell wall. In *The Pollen Tube: A Cellular and Molecular Perspective*; Malhó, R., Ed.; Springer: Berlin, Germany, 2006; Volume 3, pp. 177–200.
13. Geitmann, A. How to shape a cylinder: Pollen tube as a model system for the generation of complex cellular geometry. *Sex. Plant Reprod.* **2010**, *23*, 63–71.
14. Nguema-Ona, E.; Coimbra, S.; Vicré-Gibouin, M.; Mollet, J.C.; Driouich, A. Arabinogalactan-proteins in root and pollen tube cells: Distribution and functional aspects. *Ann. Bot.* **2012**, *110*, 383–404.

15. Cheung, A.Y.; Wu, H.M. Structural and signalling networks for the polar cell growth machinery in pollen tubes. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2008**, *59*, 547–572.
16. Moscatelli, A.; Ciampolini, F.; Rodigheiro, S.; Onelli, E.; Cresti, M.; Santo, N.; Idilli, A. Distinct endocytosis pathways identified in tobacco pollen tubes using charged nanogold. *J. Cell Sci.* **2007**, *120*, 3804–3819.
17. Bove, J.; Vaillancourt, B.; Kroeger, J.; Hepler, P.K.; Wiseman, P.W.; Geitmann, A. Magnitude and direction of vesicle dynamics in growing pollen tubes using spatiotemporal image correlation spectroscopy and fluorescence recovery after photobleaching. *Plant Physiol.* **2008**, *147*, 1646–1658.
18. Moscatelli, A.; Idilli, A.I. Pollen tube growth: A delicate equilibrium between secretory and endocytic pathways. *J. Integr. Plant Biol.* **2009**, *51*, 727–739.
19. Zonia, L. Spatial and temporal integration of signalling networks regulating pollen tube growth. *J. Exp. Bot.* **2010**, *61*, 1939–1957.
20. Roy, S.; Eckard, K.J.; Lancelle, S.; Hepler, P.K.; Lord, E.M. High-pressure freezing improves the ultrastructural preservation of *in vivo* grown lily pollen tubes. *Protoplasma* **1997**, *20*, 87–98.
21. Li, Y.Q.; Faleri, C.; Geitmann, A.; Zhang, H.Q.; Cresti, M. Immunogold localization of arabinogalactan proteins, unesterified and esterified pectins in pollen grains and pollen tubes of *Nicotiana tabacum* L. *Protoplasma* **1995**, *189*, 26–36.
22. Ferguson, C.; Teeri, T.T.; Siika-aho, M.; Read, S.M.; Bacic, A. Location of cellulose and callose in pollen tubes and grains of *Nicotiana tabacum*. *Planta* **1998**, *206*, 452–460.
23. Lennon, K.A.; Lord, E.M. The *in vivo* pollen tube cell of *Arabidopsis thaliana*. I. Tube cell cytoplasm and wall. *Protoplasma* **2000**, *214*, 45–56.
24. Derksen, J.; Knuiman, B.; Hoedemaekers, K.; Guyon, A.; Bonhomme, S.; Pierson, E.S. Growth and cellular organization of *Arabidopsis* pollen tubes *in vitro*. *Sex. Plant Reprod.* **2002**, *15*, 133–139.
25. Dardelle, F.; Lehner, A.; Ramdani, Y.; Bardor, M.; Lerouge, P.; Driouich, A.; Mollet, J.C. Biochemical and immunocytological characterizations of *Arabidopsis thaliana* pollen tube cell wall. *Plant Physiol.* **2010**, *153*, 1563–1576.
26. Chebli, Y.; Kaneda, M.; Zerzour, R.; Geitmann, A. The cell wall of the *Arabidopsis thaliana* pollen tube—Spatial distribution, recycling and network formation of polysaccharides. *Plant Physiol*. **2012**, *160*, 1940–1955.
27. Derksen, J.; Li, Y.Q.; Knuiman, B.; Geurts, H. The wall of *Pinus sylvestris* L. pollen tubes. *Protoplasma* **1999**, *208*, 26–36.
28. Yatomi, R.; Nakamura, S.; Nakamura, N. Immunochemical and cytochemical detection of wall components of germinated pollen of Gymnosperms. *Grana* **2002**, *41*, 21–28.
29. Qin, Y.; Chen, D.; Zhao, J. Localization of arabinogalactan proteins in anther, pollen, and pollen tube of *Nicotiana tabacum* L. *Protoplasma* **2007**, *231*, 43–53.
30. Parre, E.; Geitmann, A. Pectin and the role of the physical properties of the cell wall in pollen tube growth of *Solanum chacoense*. *Planta* **2005**, *220*, 582–592.
31. Hasegawa, Y.; Nakamura, S.; Kakizoe, S.; Sato, M.; Nakamura, N. Immunocytochemical and chemical analyses of Golgi vesicles isolated from the germinated pollen of *Camellia japonica*. *J. Plant Res.* **1998**, *111*, 421–429.

32. Wu, J.Z.; Lin, Y.; Zhang, X.L.; Pang, D.W.; Zhao, J. IAA stimulates pollen tube growth and mediates the modification of its wall composition and structure in *Torenia fournieri*. *J. Exp. Bot.* **2008**, *59*, 2529–2543.
33. Abreu, I.; Oliveira, M. Immunolocalisation of arabinogalactan proteins and pectins in *Actinidia deliciosa* pollen. *Protoplasma* **2004**, *224*, 123–128.
34. Puhlmann, J.; Bucheli, E.; Swain, M.J.; Dunning, N.; Albersheim, P.; Darvill, A.G.; Hahn, M.G. 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.* **1994**, *104*, 699–710.
35. Marcus, S.E.; Verhertbruggen, Y.; Herve, C.; Ordaz-Ortiz, J.J.; Farkas, V.; Pedersen, H.L.; Willats, W.G.T.; Knox, J.P. Pectic homogalacturonan masks abundant sets of xyloglucan epitopes in plant cell walls. *BMC Plant Biol.* **2008**, *8*, 60–71.
36. Clausen, M.H.; Willats, W.G.T.; Knox, J.P. Synthetic methyl hexagalacturonate hapten inhibitors of anti-homogalacturonan monoclonal antibodies LM7, JIM5 and JIM7. *Carbohydr. Res.* **2003**, *338*, 1797–1800.
37. Verhertbruggen, Y.; Marcus, S.E.; Haeger, A.; Ordaz-Ortiz, J.J.; Knox, J.P. An extended set of monoclonal antibodies to pectic homogalacturonan. *Carbohydr. Res.* **2009**, *344*, 1858–1862.
38. Willats, W.G.T.; McCartney, L.; Steele-King, C.G.; Marcus, S.E.; Mort, A.; Huisman, M.; van Alebeek, G.-J.; Schols, H.A.; Voragen, A.G.J.; Le Goff, A.; *et al*. A xylogalacturonan epitope is specifically associated with plant cell detachment. *Planta* **2004**, *218*, 673–681.
39. Jones, L.; Seymour, G.B.; Knox, J.P. Localization of pectic galactan in tomato cell walls using a monoclonal antibody specific to (1->4)-beta-D-galactan. *Plant Physiol.* **1997**, *113*, 1405–1412.
40. Willats, W.G.T.; Marcus, S.E.; Knox, J.P. Generation of a monoclonal antibody specific to (1->5)-alpha-L-arabinan. *Carbohydr. Res.* **1998**, *308*, 149–152.
41. Moller, I.; Marcus, S.E.; Haeger, A.; Verhertbruggen, Y.; Verhoef, R.; Schols, H.; Mikklesen, J.D.; Knox, J.P.; Willats, W. High-throughput screening of monoclonal antibodies against plant cell wall glycans by hierarchial clustering of their carbohydrate microarray binding profiles. *Glycoconj. J.* **2008**, *25*, 49–58.
42. Meikle, P.J.; Bonig, I.; Hoogenraad, N.J.; Clarke, A.E.; Stone, B.A. The location of (1→3)-beta-glucans in the walls of pollen tubes of *Nicotiana alata* using a (1→3)-beta-glucan-specific monoclonal antibody. *Planta* **1991**, *185*, 1–8.
43. Matoh, T.; Takasaki, M.; Takabe, K.; Kobayashi, M. Immunocytochemistry of rhamnogalacturonan II in cell walls of higher Plants. *Plant Cell Physiol.* **1998**, *39*, 483–491.
44. Johnson-Brousseau, S.A.; McCormick, S. A compendium of methods useful for characterizing *Arabidopsis* pollen mutants and gametophytically expressed genes. *Plant J.* **2004**, *39*, 761–775.
45. Rounds, C.M.; Lubeck, E.; Hepler, P.K.; Winship, L.J. Propidium iodide competes with Ca^{2+} to label pectin in pollen tubes and *Arabidopsis* root hairs. *Plant Physiol.* **2011**, *157*, 175–187.
46. Blake, A.W.; McCartney, L.; Flint, J.E.; Bolam, D.N.; Boraston, A.B.; Gilbert, H.J.; Knox, J.P. Understanding the biological rationale for the diversity of cellulose-directed carbohydrate-binding molecules in prokaryotic enzymes. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 29321–29329.
47. WallMbDB. Available online: http://glycomics.ccrc.uga.edu/wall2/jsp/abIndex.jsp/ (accessed on 6 November 2012).

48. Jauh, G.Y.; Lord, E.M. Localization of pectins and arabinogalactan-proteins in lily (*Lilium longiflorum* L.) pollen tube and style, and their possible roles in pollination. *Planta* **1996**, *199*, 251–261.
49. Mollet, J.C.; Kim, S.; Jauh, G.Y.; Lord, E.M. AGPs, pollen tube growth and the reversible effects of Yariv phenylglycoside. *Protoplasma* **2002**, *219*, 89–98.
50. Rubinstein, A.L.; Márque, J.; Cervera, M.S.; Bedinger, P.A. Extensin-like glycoproteins in the maize pollen tube wall. *Plant Cell* **1995**, *7*, 2211–2225.
51. Chen, T.; Teng, N.J.; Wu, X.Q.; Wang, Y.H.; Tang, W.; Šamaj, J.; Baluška, F.; Lin, J.X. Disruption of actin filaments by latrunculin B affects cell wall construction in *Picea meyeri* pollen tube by disturbing vesicle trafficking. *Plant Cell Physiol.* **2007**, *48*, 19–30.
52. Fernando, D.D.; Quinn, C.R.; Brenner, E.; Owens, J.N. Male gametophyte development and evolution in Gymnosperms. *Int. J. Plant Dev. Biol.* **2010**, *4*, 47–63.
53. Parre, E.; Geitmann, A. More than a leak sealant. The mechanical properties of callose in pollen tubes. *Plant Physiol.* **2005**, *137*, 274–286.
54. Derksen, J.; Janssen, G.J.; Wolters-Arts, M.; Lichtscheidl, I.; Adlassnig, W.; Ovecka, M.; Doris, F.; Steer, M. Wall architecture with high porosity is established at the tip and maintained in growing pollen tubes of *Nicotiana tabacum*. *Plant J.* **2011**, *68*, 495–506.
55. Abercrombie, J.M.; O'Meara, B.C.; Moffatt, A.R.; Williams, J.H. Developmental evolution of flowering plant pollen tube cell walls: Callose synthase (CalS) gene expression patterns. *EvoDevo* **2011**, *2*, 14.
56. Lazzaro, M.D.; Donohue, J.M.; Soodavar, F.M. Disruption of cellulose synthesis by isoxaben causes tip swelling and disorganizes cortical microtubules in elongating conifer pollen tubes. *Protoplasma* **2003**, *220*, 201–207.
57. Caffall, K.H.; Mohnen, D. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydr. Res.* **2009**, *344*, 1879–1900.
58. Micheli, F. Pectin methylesterases: Cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends Plant Sci.* **2001**, *6*, 414–419.
59. Stepka, M.; Ciampolini, F.; Charzynska, M.; Cresti, M. Localization of pectins in the pollen tube wall of *Ornithogalum virens* L. Does the pattern of pectin distribution depend on the growth rate of the pollen tube? *Planta* **2000**, *210*, 630–635.
60. Li, Y.Q.; Chen, F.; Linskens, H.F.; Cresti, M. Distribution of unesterified and esterified pectins in cell walls of pollen tubes of flowering plants. *Sex. Plant Reprod.* **1994**, *7*, 145–152.
61. Chen, K.M.; Wu, G.L.; Wang, Y.H.; Tian, C.T.; Samaj, J.; Baluska, F.; Lin, J.X. The block of intracellular calcium release affects the pollen tube development of *Picea wilsonii* by changing the deposition of cell wall components. *Protoplasma* **2008**, *233*, 39–49.
62. Willats, W.G.T.; Orfila, C.; Limberg, G.; Buchholt, H.C.; van Alebeek, G.-J.; Voragen, A.G.J.; Marcus, S.E.; Christensen, T.M.; Mikkelsen, J.D.; Murray, B.S.; *et al*. Modulation of the degree and pattern of methyl-esterification of pectic homogalacturonan in plant cell walls: implications for pectin methyl esterase action, matrix properties, and cell adhesion. *J. Biol. Chem*. **2001**, *276*, 19404–19413.
63. Fayant, P.; Girlanda, O.; Chebli, Y.; Aubin, C.; Villemure, I.; Geitmann, A. Finite element model of polar growth in pollen tubes. *Plant Cell* **2010**, *22*, 2579–2593.

64. APGIII. Angiosperm Phylogeny Group. An update of the Angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants. *Bot. J. Linn. Soc.* **2009**, *161*, 105–121.
65. Fry, S.C. Cell wall polysaccharide composition and covalent crosslinking. *Annu. Plant Rev.* **2011**, *41*, 1–42.
66. Scheller, H.V.; Ulvskov, P. Hemicelluloses. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2010**, *61*, 263–289.
67. Cosgrove, D.J. Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1999**, *50*, 391–417.
68. Freshour, G.; Bonin, C.P.; Reiter, W.D.; Albersheim, P.; Darvill, A.G.; Hahn, M.G. Distribution of fucose-containing xyloglucans in cell walls of the *mur1* mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **2003**, *131*, 1602–1612.
69. Williams, J.H. Novelties of the flowering plant pollen tube underlie diversification of a key life history stage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 11259–11263.
70. Laughlin, S.T.; Bertozzi, C.R. Imaging the glycome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 12–17.
71. Anderson, C.T.; Wallace, I.S. Illuminating the wall: Using click chemistry to image pectins in Arabidopsis cell walls. *Plant Signal. Behav*. **2012**, *7*, 661–663.
72. Anderson, C.T.; Wallace, I.S.; Somerville, C.R. Metabolic click-labeling with a fucose analog reveals pectin delivery, architecture, and dynamics in Arabidopsis cell walls. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 1329–1334.
73. Rae, A.L.; Harris, P.J.; Bacic, A.; Clarke, A.E. Composition of the cell walls of *Nicotiana alata* Link et Otto pollen tubes. *Planta* **1985**, *166*, 128–133.
74. Nakamura, N.; Suzuki, H. Sugar composition of pollen grain and pollen tube cell walls. *Phytochemistry* **1981**, *20*, 981–984.
75. Fry, S.C.; York, W.S.; Albersheim, P.; Darvill, A.; Hayashi, T.; Joseleau, J.P.; Seitz, H.U.; Kato, Y.; Pérez Lorences, E.; Maclachlan, G.A.; *et al*. An unambiguous nomenclature for xyloglucan-derived oligosaccharides. *Physiol. Plant* **1993**, *89*, 1–3.
76. Cavalier, D.M.; Lerouxel, O.; Neumetzler, L.; Yamauchi, K.; Reinecke, A.; Freshour, G.; Zabotina, O.A.; Hahn, M.G.; Burgert, I.; Pauly, M.; *et al*. Disrupting two *Arabidopsis thaliana* xylosyltransferase genes results in plants deficient in xyloglucan, a major primary cell wall component. *Plant Cell* **2008**, *20*, 1519–1537.
77. Günl, M.; Kraemer, F.; Pauly, M. Oligosaccharide Mass Profiling (OLIMP) of Cell Wall Polysaccharides by MALDI-TOF/MS. In *The Plant Cell Wall: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*; Popper, Z.A., Ed.; Springer, Humana Press: New York, NY, USA, 2011; Volume 715, pp. 43–54.
78. Lerouxel, O.; Choo, T.S.; Seveno, M.; Usadel, B.; Faye, L.; Lerouge, P.; Pauly, M. Rapid structural phenotyping of plant cell wall mutants by enzymatic oligosaccharide fingerprinting. *Plant Physiol.* **2002**, *130*, 1754–1763.
79. Copyright American Society of Plant Biologists. Available online: http://www.plantphysiol.org/ (accessed on 19 February 2013).

80. Sekkal, M.; Huvenne, J.-P.; Legrand, P.; Sombret, B.; Mollet, J.-C.; Mouradi-Givernaud, A.; Verdus, M.-C. Direct structural identification of polysaccharides from red algae by FTIR microspectrometry. I. Localization of agar in *Gracilaria verrucosa* sections. *Microchim. Acta* **1993**, *112*, 1–10.
81. Chen, L.; Carpita, N.C.; Reiter, W.D.; Wilson, R.H.; Jeffries, C.; McCann, M.C. A rapid method to screen for cell-wall mutants using discriminant analysis of Fourier transform infrared spectra. *Plant J.* **1998**, *16*, 385–392.
82. Mouille, G.; Robin, S.; Lecomte, M.; Pagant, S.; Höfte, H. Classification and identification of *Arabidopsis* cell wall mutants using Fourier-Transform InfraRed (FT-IR) microspectroscopy. *Plant J.* **2003**, *35*, 393–404.
83. Wang, Q.; Lu, L.; Wu, X.; Li, Y.; Lin, J. Boron influences pollen germination and pollen tube growth in *Picea meyeri*. *Tree Physiol.* **2003**, *23*, 345–351.
84. Wang, Q.L.; Kong, L.A.; Hao, H.Q.; Wang, X.H.; Lin, J.X.; Samaj, J.; Baluska, F. Effects of brefeldin A on pollen germination and tube growth: Antagonistic effects on endocytosis and secretion. *Plant Physiol.* **2005**, *139*, 1692–1703.
85. Wang, Y.; Chen, T.; Zhang, C.; Hao, H.; Liu, P.; Zheng, M.; Baluska, F.; Samaj, J.; Lin, J. Nitric oxide modulates the influx of extracellular Ca^{2+} and actin filament organization during cell wall construction in *Pinus bungeana* pollen tubes. *New Phytol.* **2009**, *182*, 851–862.
86. Mohnen, D. Pectin structure and biosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2008**, *11*, 266–277.
87. Driouich, A.; Follet-Gueye, M.L.; Bernard, S.; Kousar, S.; Chevalier, L.; Vicré-Gibouin, M.; Lerouxel, O. Golgi-mediated synthesis and secretion of matrix polysaccharides of the primary cell wall of higher plants. *Front. Plant Sci.* **2012**, *3*, doi:10.3389/fpls.2012.00079.
88. Akita, K.; Ishimizu, T.; Tsukamoto, T.; Ando, T.; Hase, S. Successive glycosyltransfer activity and enzymatic characterization of pectic polygalacturonate 4-alpha-galacturonosyltransferase solubilized from pollen tubes of *Petunia axillaris* using pyridylaminated oligogalacturonates as substrates. *Plant Physiol.* **2002**, *130*, 374–379.
89. Caffall, K.H.; Pattathil, S.; Phillips, S.; Hahn, M.G.; Mohnen, D. *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutants implicate GAUT genes in the biosynthesis of pectin and xylan in cell walls and seed testa. *Mol. Plant* **2009**, *2*, 1000–1014.
90. Kong, Y.; Zhou, G.; Yin, Y.; Xu, Y.; Pattathil, S.; Hahn, M.G. Molecular analysis of a family of *Arabidopsis* genes related to galacturonosyltransferases. *Plant Physiol.* **2011**, *155*, 1791–1805.
91. Sterling, J.D.; Atmodjo, M.A.; Inwood, S.E.; Kumar Kolli, V.S.; Quigley, H.F.; Hahn, M.G.; Mohnen, D. Functional identification of an *Arabidopsis* pectin biosynthetic homogalacturonan galacturonosyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 5236–5241.
92. Bouton, S.; Leboeuf, E.; Mouille, G.; Leydecker, M.T.; Talbotec, J.; Granier, F.; Lahaye, M.; Höfte, H.; Truong, H.N. QUASIMODO1 encodes a putative membrane-bound glycosyltransferase required for normal pectin synthesis and cell adhesion in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **2002**, *14*, 2577–2590.
93. Qin, Y.; Leydon, A.R.; Manziello, A.; Pandey, R.; Mount, D.; Denic, S.; Vasic, B.; Johnson, M.A.; Palanivelu, R. Penetration of the stigma and style elicits a novel transcriptome in pollen tubes, Pointing to genes critical for growth in a pistil. *PLoS Genet.* **2009**, *5*, e1000621.

94. Jensen, J.K.; Sørensen, S.O.; Harholt, J.; Geshi, N.; Sakuragi, Y.; Møller, I.; Zandleven, J.; Bernal, A.J.; Jensen, N.B.; Sørensen, C.; *et al*. Identification of a xylogalacturonan xylosyltransferase involved in pectin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **2008**, *20*, 1289–1302.
95. Harholt, J.; Suttangkakul, A.; Scheller, H.V. Biosynthesis of pectin. *Plant Physiol.* **2010**, *153*, 384–395.
96. Konishi, T.; Takeda, T.; Miyazaki, Y.; Ohnishi-Kameyama, M.; Hayashi, T.; O'Neill, M.A.; Ishii, T. A plant mutase that interconverts UDP-arabinofuranose and UDP-arabinopyranose. *Glycobiology* **2007**, *17*, 345–354.
97. Drakakaki, G.; Zabotina, O.; Delgado, I.; Robert, S.; Keegstra, K.; Raikhel, N. *Arabidopsis* reversibly glycosylated polypeptides 1 and 2 are essential for pollen development. *Plant Physiol.* **2006**, *142*, 1480–1492.
98. Rautengarten, C.; Ebert, B.; Herter, T.; Petzold, C.J.; Ishii, T.; Mukhopadhyay, A.; Usadel, B.; Scheller, H.V. The interconversion of UDP-arabinopyranose and UDP-arabinofuranose is indispensable for plant development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **2011**, *23*, 1373–1390.
99. Iwai, H.; Hokura, A.; Oishi, M.; Chida, H.; Ishii, T.; Sakai, S.; Satoh, S. The gene responsible for borate cross-linking of pectin Rhamnogalacturonan-II is required for plant reproductive tissue development and fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 16592–16597.
100. Wu, A.M.; Rihouey, C.; Seveno, M.; Hörnblad, E.; Singh, S.; Matsunaga, T.; Ishii, T.; Lerouge, P.; Marchant, A. The *Arabidopsis* IRX10 and IRX10-LIKE glycosyltransferases are critical for glucuronoxylan biosynthesis during secondary cell wall formation. *Plant J.* **2009**, *57*, 718–731.
101. Brown, D.M.; Zhang, Z.; Stephens, E.; Dupree, P.; Turner, S.R. Characterization of IRX10 and IRX10-like reveals an essential role in glucuronoxylan biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J.* **2009**, *57*, 732–746.
102. Delmas, F.; Séveno, M.; Northey, J.G.; Hernould, M.; Lerouge, P.; McCourt, P.; Chevalier, C. 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.* **2008**, *59*, 2639–2647.
103. Liu, X.L.; Liu, L.; Niu, Q.K.; Xia, C.; Yang, K.Z.; Li, R.; Chen, L.Q.; Zhang, X.Q.; Zhou, Y.; Ye, D. Male gametophyte defective 4 encodes a rhamnogalacturonan II xylosyltransferase and is important for growth of pollen tubes and roots in *Arabidopsis*. *Plant J.* **2011**, *65*, 647–660.
104. Deng, Y.; Wang, W.; Li, W.Q.; Xia, C.; Liao, H.Z.; Zhang, X.Q.; Ye, D. 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.* **2010**, *52*, 829–843.
105. Kobayashi, M.; Kouzu, N.; Inami, A.; Toyooka, K.; Konishi, Y.; Matsuoka, K.; Matoh, T. Characterization of *Arabidopsis* CTP:3-deoxy-D-manno-2-octulosonate cytidylyltransferase (CMP-KDO synthetase), the enzyme that activates KDO during rhamnogalacturonan II biosynthesis. *Plant Cell Physiol.* **2011**, *52*, 1832–1843.
106. Goubet, F.; Mohnen, D. Solubilization and partial characterization of homogalacturonan-methyltransferase from microsomal membranes of suspension-cultured tobacco cells. *Plant Physiol.* **1999**, *121*, 281–290.

107. Pauly, M.; Scheller, H.V. *O*-Acetylation of plant cell wall polysaccharides: Identification and partial characterization of a rhamnogalacturonan *O*-acetyl-transferase from potato suspension-cultured cells. *Planta* **2000**, *210*, 659–667.
108. Mouille, G.; Ralet, M.C.; Cavelier, C.; Eland, C.; Effroy, D.; Hématy, K.; McCartney, L.; Truong, H.N.; Gaudon, V.; Thibault, J.F.; *et al*. Homogalacturonan synthesis in *Arabidopsis thaliana* requires a Golgi-localized protein with a putative methyltransferase domain. *Plant J.* **2007**, *50*, 605–614.
109. Miao, Y.; Li, H.Y.; Shen, J.; Wang, J.; Jiang, L. QUASIMODO 3 (QUA3) is a putative homogalacturonan methyltransferase regulating cell wall biosynthesis in *Arabidopsis* suspension-cultured cells. *J. Exp. Bot.* **2011**, *62*, 5063–5078.
110. Manabe, Y.; Nafisi, M.; Verhertbruggen, Y.; Orfila, C.; Gille, S.; Rautengarten, C.; Cherk, C.; Marcus, S.E.; Somerville, S.; Pauly, M.; *et al*. Loss-of-function mutation of REDUCED WALL ACETYLATION2 in *Arabidopsis* leads to reduced cell wall acetylation and increased resistance to *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol.* **2011**, *155*, 1068–1078.
111. Zabotina, O.A. Xyloglucan and its biosynthesis. *Front. Plant Sci.* **2012**, *3*, doi:10.3389/fpls.2012.00134.
112. Cocuron, J.C.; Lerouxel, O.; Drakakaki, G.; Alonso, A.P.; Liepman, A.H.; Keegstra, K.; Raikhel, N.; Wilkerson, C.G. A gene from the cellulose synthase-like C family encodes a beta-1,4 glucan synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 8550–8555.
113. Cavalier, D.M.; Keegstra, K. Two xyloglucan xylosyltransferases catalyze the addition of multiple xylosyl residues to cellohexaose. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 34197–34207.
114. Vuttipongchaikij, S.; Brocklehurst, D.; Steele-King, C.; Ashford, D.A.; Gomez, L.D.; McQueen-Mason, S.J. *Arabidopsis* GT34 family contains five xyloglucan α-1,6-xylosyltransferases. *New Phytol.* **2012**, *195*, 585–595.
115. Madson, M.; Dunand, C.; Li, X.; Verma, R.; Vanzin, G.F.; Caplan, J.; Shoue, D.A.; Carpita, N.C.; Reiter, W.D. The MUR3 gene of *Arabidopsis* encodes a xyloglucan galactosyltransferase that is evolutionarily related to animal exostosins. *Plant Cell* **2003**, *15*, 1662–1670.
116. Jensen, J.K.; Schultink, A.; Keegstra, K.; Wilkerson, C.G.; Pauly, M. RNA-Seq analysis of developing nasturtium seeds (*Tropaeolum majus*): Identification and characterization of an additional galactosyltransferase involved in xyloglucan biosynthesis. *Mol. Plant* **2012**, *5*, 984–992.
117. Perrin, R.M.; DeRocher, A.E.; Bar-Peled, M.; Zeng, W.; Norambuena, L.; Orellana, A.; Raikhel, N.V.; Keegstra, K. Xyloglucan fucosyltransferase, an enzyme involved in plant cell wall biosynthesis. *Science* **1999**, *284*, 1976–1979.
118. Vanzin, G.F.; Madson, M.; Carpita, N.C.; Raikhel, N.V.; Keegstra, K.; Reiter, W.D. The *mur2* mutant of *Arabidopsis thaliana* lacks fucosylated xyloglucan because of a lesion in fucosyltransferase AtFUT1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 3340–3345.
119. Guerriero, G.; Fugelstad, J.; Bulone, V. What do we really know about cellulose biosynthesis in Higher Plants? *J. Integr. Plant Biol.* **2010**, *52*, 161–175.
120. Richmond, T. Higher plant cellulose synthases. *Genome Biol.* **2000**, *1*, reviews3001.1–reviews3001.6.
121. Doblin, M.S.; Kurek, I.; Jacob-Wilk, D.; Delmer, D.P. Cellulose biosynthesis in plants: From genes to rosettes. *Plant Cell Physiol.* **2002**, *43*, 1407–1420.

122. Richmond, T.A.; Somerville, C.R. Integrative approaches to determining Csl function. *Plant Mol. Biol.* **2001**, *47*, 131–143.
123. Bernal, A.J.; Yoo, C.M.; Mutwil, M.; Jensen, J.K.; Hou, G.; Blaukopf, C.; Sørensen, I.; Blancaflor, E.B.; Scheller, H.V.; Willats, W.G. Functional analysis of the cellulose synthase-like genes CSLD1, CSLD2, and CSLD4 in tip-growing *Arabidopsis* cells. *Plant Physiol.* **2008**, *148*, 1238–1253.
124. Wang, L.; Guo, K.; Li, Y.; Tu, Y.; Hu, H.; Wang, B.; Cui, X.; Peng, L. Expression profiling and integrative analysis of the CESA/CSL superfamily in rice. *BMC Plant Biol.* **2010**, *10*, 282.
125. Doblin, M.S.; de Melis, L.; Newbigin, E.; Bacic, A.; Read, S.M. Pollen tubes of *Nicotiana alata* express two genes from different β-Glucan synthase families. *Plant Physiol.* **2001**, *125*, 2040–2052.
126. Cai, G.; Faleri, C.; Del Casino, C.; Emons, A.M.C.; Cresti, M. 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.* **2011**, *155*, 1169–1190.
127. Wang, W.; Wang, L.; Chen, C.; Xiong, G.; Tan, X.Y.; Yang, K.Z.; Wang, Z.C.; Zhou, Y.; Ye, D.; Chen, L.Q. *Arabidopsis* CSLD1 and CSLD4 are required for cellulose deposition and normal growth of pollen tubes. *J. Exp. Bot.* **2011**, *62*, 5161–5177.
128. Persson, S.; Paredez, A.; Carroll, A.; Palsdottir, H.; Doblin, M.; Poindexter, P.; Khitrov, N.; Auer, M.; Somerville, C.R. Genetic evidence for three unique components in primary cell-wall cellulose synthase complexes in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 15566–15571.
129. Boavida, L.C.; Shuai, B.; Yu, H.J.; Pagnussat, G.C.; Sundaresan, V.; McCormick, S. A collection of Ds insertional mutants associated with defects in male gametophyte development and function in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **2009**, *181*, 1369–1385.
130. Verma, D.P.; Hong, Z. Plant callose synthase complexes. *Plant Mol. Biol.* **2001**, *47*, 693–701.
131. Nishikawa, S.; Zinkl, G.M.; Swanson, R.J.; Maruyama, D.; Preuss, D. Callose (beta-1,3 glucan) is essential for *Arabidopsis* pollen wall patterning, but not tube growth. *BMC Plant Biol.* **2005**, *5*, 15.
132. Dong, X.; Hong, Z.; Sivaramakrishnan, M.; Mahfouz, M.; Verma, D.P. Callose synthase (CalS5) is required for exine formation during microgametogenesis and for pollen viability in *Arabidopsis*. *Plant J.* **2005**, *42*, 315–328.
133. Brownfield, L.; Ford, K.; Doblin, M.S.; Newbigin, E.; Read, S.; Bacic, A. Proteomic and biochemical evidence links the callose synthase in *Nicotiana alata* pollen tubes to the product of the NaGSL1 gene. *Plant J.* **2007**, *52*, 147–156.
134. Brownfield, L.; Wilson, S.; Newbigin, E.; Bacic, A.; Read, S. Molecular control of the glucan synthase-like protein NaGSL1 and callose synthesis during growth of *Nicotiana alata* pollen tubes. *Biochem. J.* **2008**, *414*, 43–52.
135. Pacini, E.; Franchi, G.G.; Ripaccioli, M. Ripe pollen structure and histochemistry of some Gymnosperms. *Plant Syst. Evol.* **1999**, *217*, 81–99.
136. McQueen-Mason, S.; Durachko, D.M.; Cosgrove, D.J. Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. *Plant Cell* **1992**, *4*, 1425–1433.
137. Li, Z.-C.; Durachko, D.M.; Cosgrove, D.J. An oat coleoptile wall protein that induces wall extension *in vitro* and that is antigenically related to a similar protein from cucumber hypocotyls. *Planta* **1993**, *191*, 349–356.

138. Sampedro, J.; Cosgrove, D.J. The expansin superfamily. *Genome Biol.* **2005**, *6*, 1–11.
139. McQueen-Mason, S.; Cosgrove, D.J. Disruption of hydrogen bonding between plant cell wall polymers by proteins that induce wall extension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 6574–6578.
140. McQueen-Mason, S.; Cosgrove, D.J. Expansin mode of action on cell walls. Analysis of wall hydrolysis, stress relaxation, and binding. *Plant Physiol.* **1995**, *107*, 87–100.
141. Sharova, E.I. Expansins: Proteins involved in cell wall softening during plant growth and morphogenesis. *Russ. J. Plant Physiol.* **2007**, *54*, 713–727.
142. Arabidopsis genes. Available online: https://homes.bio.psu.edu/expansins/arabidopsis.htm/ (accessed on 6 November 2012).
143. Dai, S.; Li, L.; Chen, T.; Chong, K.; Xue, Y.; Wang, T. Proteomic analyses of *Oryza sativa* mature pollen reveal novel proteins associated with pollen germination and tube growth. *Proteomics* **2006**, *6*, 2504–2529.
144. Li, L.C.; Bedinger, P.A.; Volk, C.; Jones, A.D.; Cosgrove, D.J. Purification and characterization of four β-expansins (*Zea* m 1 Isoforms) from maize pollen. *Plant Physiol.* **2003**, *132*, 2073–2085.
145. Jin, Y.; Tashpulatov, A.S.; Katholnigg, H.; Heberle-Bors, E.; Touraev, A. Isolation and characterization of two wheat β-expansin genes expressed during male gametophyte development. *Protoplasma* **2006**, *228*, 13–19.
146. Zaidi, M.A.; O'Leary, S.; Wu, S.; Gleddie, S.C.; Eudes, F.; Laroche, A.; Robert, L.S. A molecular and proteomic investigation of proteins rapidly released from triticale pollen upon hydration. *Plant Mol Biol.* **2012**, *79*, 101–121.
147. Cosgrove, D.J.; Bedinger, P.; Durachko, D.M. Group 1 allergens of grass pollen as cell wall-loosening agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 6559–6564.
148. Winter, D.; Vinegar, B.; Nahal, H.; Ammar, R.; Wilson, G.V.; Provart, N.J. An "Electronic fluorescent pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS One* **2007**, *2*, e718.
149. Magrane, M.; UniProt Consortium. UniProt Knowledgebase: A hub of integrated protein data. *Database* **2011**, doi:10.1093/database/bar009.
150. Hende, H.; Bradford, K.J.; Brummel, D.A.; Cho, H.T.; Cosgrove, D.J.; Fleming, A.J.; Gehring, C.; Lee, Y.; McQuenn-Mason, S.; Rose, J.K.C.; *et al*. Nomenclature for members of the expansin superfamily of genes and proteins. *Plant Mol. Biol.* **2004**, *55*, 311–314.
151. Swanson, R.; Clark, T.; Preuss, D. Expression profiling of *Arabidopsis* stigma tissue identifies stigma-specific genes. *Sex. Plant Reprod.* **2005**, *18*, 163–171.
152. Rose, J.K.C.; Braam, J.; Fry, S.C.; Nishitani, K. The XTH family of enzymes involved in xyloglucan endotransglucosylation and endohydrolysis: Current perspectives and a new unifying nomenclature. *Plant Cell Physiol.* **2002**, *43*, 1421–1435.
153. Fry, S.C.; Smith, R.C.; Renwick, K.F.; Martin, D.J.; Hodge, S.K.; Matthews, K.J. Xyloglucan endotransglycosylase, a new wall-loosening enzyme activity from plants. *Biochem. J.* **1992**, *282*, 821–828.
154. Nishitani, K.; Tominaga, R. Endo-xyloglucan transferase, a novel class of glycosyltransferase that catalyzes transfer of a segment of xyloglucan molecule to another xyloglucan molecule. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 21058–21064.

155. Yokoyama, R.; Nishitani, K. A comprehensive expression analysis of all members of a gene family encoding cell-wall enzymes allowed us to predict *cis*-regulatory regions involved in cell wall construction in specific organs of *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* **2001**, *42*, 1025–1033.
156. Yokoyama, R.; Rose, J.K.C.; Nishitani, K. A surprising diversity and abundance of xyloglucan endotransglucosylase/hydrolases in rice. Classification and expression analysis. *Plant Physiol.* **2004**, *134*, 1088–1099.
157. Becnel, J.; Natarajan, M.; Kipp, A.; Braam, J. Developmental expression patterns of *Arabidopsis* XTH genes reported by transgenes and Genevestigator. *Plant Mol. Biol.* **2006**, *61*, 451–467.
158. Kurasawa, K.; Matsui, A.; Yokoyama, R.; Kuriyama, T.; Yoshizumi, T.; Matsui, M.; Suwabe, K.; Watanabe, M.; Nishitani, K. The *AtXTH28* gene, a xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase, is involved in automatic self-pollination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **2009**, *50*, 413–422.
159. Zhang, G.F.; Staehelin, L.A. Functional compartmentation of the Golgi apparatus of plant cells: Immunocytochemical analysis of high-pressure frozen- and freeze-substituted sycamore maple suspension culture cells. *Plant Physiol.* **1992**, *99*, 1070–1083.
160. Gaffe, J.; Tieman, D.M.; Handa, A.K. Pectin methylesterase isoforms in tomato (*Lycopersicon esculentum*) tissues (effects of expression of a pectin methylesterase antisense gene). *Plant Physiol.* **1994**, *105*, 199–203.
161. Rhee, S.Y.; Somerville, C.R. Tetrad pollen formation in quartet mutants of *Arabidopsis thaliana* is associated with persistence of pectic polysaccharides of the pollen mother cell wall. *Plant J.* **1998**, *15*, 79–88.
162. Rhee, S.Y.; Osborne, E.; Poindexter, P.D.; Somerville, C.R. Microspore separation in the *quartet 3* mutants of Arabidopsis is impaired by a defect in a developmentally regulated polygalacturonase required for pollen mother cell-wall degradation. *Plant Physiol*. **2003**, *133*, 1170–1180.
163. Francis, K.E.; Lam, S.Y.; Copenhaver, G.P. Separation of Arabidopsis pollen tetrads is regulated by QUARTET1, a pectin methyl-esterase gene. *Plant Physiol*. **2006**, *142*, 1004–1013.
164. Wolf, S.; Mouille, G.; Pelloux, J. Homogalacturonan methyl-esterification and plant development. *Mol. Plant* **2009**, *2*, 851–860.
165. Zhu, Y.; Zhao, P.; Wu, X.; Wang, W.; Scali, M.; Cresti, M. Proteomic identification of differentially expressed proteins in mature and germinated maize pollen. *Acta Physiol. Plant* **2011**, *33*, 1467–1474.
166. Ge, W.; Song, Y.; Zhang, C.; Zhang, Y.; Burlingame, A.L.; Guo, Y. Proteomic analyses of apoplastic proteins from germinating *Arabidopsis thaliana* pollen. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1814*, 1964–1973.
167. Li, Y.Q.; Mareck, A.; Faleri, C.; Moscatelli, A.; Liu, Q.; Cresti, M. Detection and localization of pectin methylesterase isoforms in pollen tubes of *Nicotiana tabacum* L. *Planta* **2002**, *214*, 734–740.
168. Jiang, L.; Yang, S.L.; Xie, L.F.; Puah, C.S.; Zhang, X.Q.; Yang, W.C.; Sundaresan, V.; Ye, D. VANGUARD1 encodes a pectin methylesterase that enhances pollen tube growth in the *Arabidopsis* style and transmitting tract. *Plant Cell* **2005**, *17*, 584–596.
169. Tian, G.W.; Chen, M.H.; Zaltsman, A.; Citovsky, V. Pollen-specific pectin methylesterase involved in pollen tube growth. *Dev. Biol.* **2006**, *294*, 83–91.

170. Bosch, M.; Cheung, A.Y.; Hepler, P.K. Pectin methylesterase, a regulator of pollen tube growth. *Plant Physiol.* **2005**, *138*, 1334–1346.
171. Wolf, S.; Grsic-Rausch, S.; Rausch, T.; Greiner, S. Identification of pollen-expressed pectin methylesterase inhibitors in *Arabidopsis*. *FEBS Lett.* **2003**, *555*, 551–555.
172. Raiola, A.; Camardella, L.; Giovane, A.; Mattei, B.; de Lorenzo, G.; Cervone, F.; Bellincampi, D. Two *Arabidopsis thaliana* genes encode functional pectin methylesterase inhibitors. *FEBS Lett.* **2004**, *557*, 199–203.
173. Pina, C.; Pinto, F.; Feijó, J.A.; Becker, J.D. Gene family analysis of the *Arabidopsis* pollen transcriptome reveals biological implications for cell growth, division control, and gene expression regulation. *Plant Physiol.* **2005**, *138*, 744–756.
174. Zhang, G.Y.; Feng, J.; Wu, J.; Wang, X.W. BoPMEI1, a pollen-specific pectin methylesterase inhibitor, has an essential role in pollen tube growth. *Planta* **2010**, *231*, 1323–1334.
175. Lehner, A.; Leroux, C.; Mollet, J.C. University of Rouen, Mont Saint-Aignan, France. Unpublished work, 2013.
176. Röckel, N.; Wolf, S.; Kost, B.; Rausch, T.; Greiner, S. Elaborate spatial patterning of cell-wall PME and PMEI at the pollen tube tip involves PMEI endocytosis, and reflects the distribution of esterified and de-esterified pectins. *Plant J.* **2008**, *53*, 133–143.
177. Leboeuf, E.; Guillon, F.; Thoiron, S.; Lahaye, M. Biochemical and immunohistochemical analysis of pectic polysaccharides in the cell walls of *Arabidopsis* mutant QUASIMODO 1 suspension-cultured cells: Implications for cell adhesion. *J. Exp. Bot.* **2005**, *56*, 3171–3182.
178. Durand, C.; Vicre-Gibouin, M.; Follet-Gueye, M.L.; Duponchel, L.; Moreau, M.; Lerouge, P.; Driouich, A. The organization pattern of root border-likes cells of *Arabidopsis thaliana* is dependent on cell wall homogalacturonan. *Plant Physiol.* **2009**, *150*, 1411–1421.
179. Mollet, J.C.; Park, S.Y.; Nothnagel, E.A.; Lord, E.M. A lily stylar pectin is necessary for pollen tube adhesion to an *in vitro* stylar matrix. *Plant Cell* **2000**, *12*, 1737–1749.
180. Park, S.Y.; Jauh, G.Y.; Mollet, J.C.; Eckard, K.J.; Nothnagel, E.A.; Walling, L.L.; Lord, E.M. A lipid transfer-like protein is necessary for lily pollen tube adhesion to an *in vitro* stylar matrix. *Plant Cell* **2000**, *12*, 151–164.
181. Tung, C.W.; Dwyer, K.G.; Nasrallah, M.E.; Nasrallah, J.B. Genome-wide identification of genes expressed in *Arabidopsis* pistils specifically along the path of pollen tube growth. *Plant Physiol.* **2005**, *138*, 977–989.
182. Nieuwland, J.; Feron, R.; Huisman, B.A.H.; Fasolino, A.; Hilbers, C.W.; Derksen, J.; Mariani, C. Lipid transfer proteins enhance cell wall extension in tobacco. *Plant Cell* **2005**, *17*, 2009–2019.
183. Chae, K.; Kieslich, C.A.; Morikis, D.; Kim, S.C.; Lord, E.M. A gain-of-function mutation of *Arabidopsis* lipid transfer protein 5 disturbs pollen tube tip growth and fertilization. *Plant Cell* **2009**, *21*, 3902–3914.
184. Gou, J.Y.; Miller, L.M.; Hou, G.; Yu, X.H.; Chen X.Y.; Liu, C.J. Acetylesterase-mediated deacetylation of pectin impairs cell elongation, pollen germination and Plant reproduction. *Plant Cell* **2012**, *24*, 50–65.
185. Wing, R.A.; Yamaguchi, J.; Larabell, S.K.; Ursin, V.M.; McCormick, S**.** Molecular and genetic characterization of two pollen−expressed genes that have sequence similarity to pectate lyases of the plant pathogen *Erwinia*. *Plant Mol. Biol*. **1989**, *14*, 17–28.

186. Wu, Y.; Qiu, X.; Du, S.; Erickson, L. PO149, a new member of pollen pectate lyase-like gene family from alfalfa. *Plant Mol. Biol*. **1996**, *32*, 1037–1042.
187. Kulikauskas, R.; McCormick, S. Identification of the tobacco and *Arabidopsis* homologues of the pollen-expressed LAT59 gene of tomato. *Plant Mol. Biol.* **1997**, *34*, 809–814.
188. Marin-Rodriguez, M.V.; Orchard, J.; Seymour, G.B. Pectate lyases, cell wall degradation and fruit softening. *J. Exp. Bot.* **2002**, *53*, 2115–2119.
189. Palusa, S.G.; Golovkin, M.; Shin, S.B.; Richardson, D.N.; Reddy, A.S. Organ-specific, developmental, hormonal and stress regulation of expression of putative pectate lyase genes in *Arabidopsis*. *New Phytol.* **2007**, *174*, 537–550.
190. Sun, L.; van Nocker, S. Analysis of promoter activity of members of the PECTATE LYASE-LIKE (PLL) gene family in cell separation in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol.* **2010**, *10*, 152.
191. Dai, S.; Chen, T.; Chong, K.; Xue, Y.; Liu, S.; Wang, T. Proteomics identification of differentially expressed proteins associated with pollen germination and tube growth reveals characteristics of germinated *Oryza sativa* pollen. *Mol. Cell. Proteomics* **2007**, *6*, 207–230.
192. Henrissat, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J.* **1991**, *280*, 309–316.
193. Glycoside Hydrolase Family Classification. Available online: http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html/ (accessed on 23 October 2012).
194. Del Campillo, E.; Lewis, L.N. Occurrence of 9.5 cellulase and other hydrolases in flower reproductive organs undergoing major cell wall disruption. *Plant Physiol.* **1992**, *99*, 1015–1020.
195. Aouar, L.; Chebli, Y.; Geitmann, A. Morphogenesis of complex plant cell shapes: The mechanical role of crystalline cellulose in growing pollen tubes. *Sex. Plant Reprod*. **2010**, *23*, 15–27.
196. Roggen, H.P.J.; Stanley, R.G. Cell-wall-hydrolysing enzymes in wall formation as measured by pollen-tube extension. *Planta* **1969**, *84*, 295–303.
197. Takeda, H.; Yoshikawa, T.; Liu, X.Z.; Nakagawa, N.; Li, Y.Q.; Sakurai, N. Molecular cloning of two exo-beta-glucanases and their *in vivo* substrates in the cell walls of lily pollen tubes. *Plant Cell Physiol.* **2004**, *45*, 436–444.
198. Kotake, T.; Li, Y.Q.; Takahashi, M.; Sakurai, N. Characterization and function of wall-bound exo-beta-glucanases of *Lilium longiflorum* pollen tubes. *Sex. Plant Reprod.* **2000**, *13*, 1–9.
199. Hruba, P.; Honys, D.; Twell, D.; Capkova, V.; Tupy, J. Expression of beta-galactosidase and beta-xylosidase genes during microspore and pollen development. *Planta* **2005**, *220*, 931–940.
200. Pressey, R.; Reger, B.J. Polygalacturonase in pollen from corn and other grasses. *Plant Sci.* **1969**, *59*, 57–62.
201. Hadfield, K.A.; Bennett, A.B. Polygalacturonases: Many genes in search of a function. *Plant Physiol.* **1998**, *117*, 337–343.
202. Arabidopsis Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **2000**, *408*, 796–815.
203. González-Carranza, Z.H.; Elliott, K.A.; Roberts, J.A. Expression of polygalacturonases and evidence to support their role during cell separation processes in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* **2007**, *58*, 3719–3730.

204. Kim, J.; Shiu, S.H.; Thoma, S.; Li, W.H.; Patterson, S.E. Patterns of expansion and expression divergence in the plant polygalacturonase gene family. *Genome Biol.* **2007**, *7*, R87.
205. Torki, M.; Mandaron, P.; Mache, R.; Falconet, D. Characterization of a ubiquitous expressed gene family encoding polygalacturonase in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* **2000**, *242*, 427–436.
206. Huang, L.; Ye, Y.; Zhang, Y.; Zhang, A.; Liu, T.; Cao, J. BcMF9, a novel polygalacturonase gene, is required for both *Brassica campestris* intine and exine formation. *Ann. Bot.* **2009**, *104*, 1339–1351.
207. Huang, L.; Cao, J.; Zhang, A.; Ye, Y.; Zhang, Y.; Liu, T. The polygalacturonase gene BcMF2 from *Brassica campestris* is associated with intine development. *J. Exp. Bot.* **2009**, *60*, 301–313.
208. Tamari, F.; Shore, J.S. Allelic variation for a short-specific polygalacturonase in *Turnera subulata*: Is it associated with the degree of self-compatibility? *Int. J. Plant Sci.* **2006**, *167*, 125–133.
209. Dearnaley, J.D.W.; Daggard, G.A. Expression of a polygalacturonase enzyme in germinating pollen of *Brassica napus*. *Sex. Plant Reprod.* **2001**, *13*, 265–271.
210. Bosch, M.; Hepler, P.K. Pectin methylesterases and pectin dynamics in pollen tubes. *Plant Cell* **2005**, *17*, 3219–3226.
211. Dey, P.M.; del Campillo, E. Biochemistry of the multiple forms of glycosidases in plants. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **1984**, *56*, 141–249.
212. Ahn, Y.O.; Zheng, M.; Bevan, D.R.; Esen, A.; Shiu, S.H.; Benson, J.; Peng, H.P.; Miller, J.T.; Cheng, C.L.; Poulton, J.E.; *et al*. Functional genomic analysis of *Arabidopsis thaliana* glycoside hydrolase family 35. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 1510–1520.
213. Tanthanuch, W.; Chantarangsee, M.; Maneesan, J.; Ketudat-Cairns, J. Genomic and expression analysis of glycosyl hydrolase family 35 genes from rice (*Oryza sativa* L.). *BMC Plant Biol.* **2008**, *8*, 84.
214. Singh, M.B.; Knox, R.B. Grass pollen allergens: Antigenic relationships detected using monoclonal antibodies and dot blotting immunoassay. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **1985**, *78*, 300–304.
215. Cheung, A.Y.; Wang, H.; Wu, H.M. A floral transmitting tissue-specific glycoprotein attracts pollen tubes and stimulates their growth. *Cell* **1995**, *82*, 383–393.
216. Wu, H.M.; Wang, H.; Cheung, A.Y. A pollen tube growth stimulatory glycoprotein is deglycosylated by pollen tubes and displays a glycosylation gradient in the flower. *Cell* **1995**, *82*, 395–403.
217. Rogers, H.J.; Maund, S.L.; Johnson, L.H. A β-galactosidase-like gene is expressed during tobacco pollen development. *J. Exp. Bot.* **2001**, *52*, 67–75.
218. Walker, M.; Tehseen, M.; Doblin, M.S.; Pettolino, F.A.; Wilson, S.M.; Bacic, A.; Golz, J.F. The transcriptional regulator LEUNIG_HOMOLOG regulates mucilage release from the *Arabidopsis* testa. *Plant Physiol.* **2011**, *156*, 46–60.
219. Western, T.L.; Burn, J.; Tan, W.L.; Skinner, D.J.; Martin-McCaffrey, L.; Moffatt, B.A.; Haughn, G.W. Isolation and characterization of mutants defective in seed coat mucilage secretory cell development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **2001**, *127*, 998–1011.
220. Sampedro, J.; Pardo, B.; Gianzo, C.; Guitian, E.; Revilla, G.; Zarra, I. Lack of alpha-xylosidase activity in *Arabidopsis* alters xyloglucan composition and results in growth defects. *Plant Physiol*. **2010**, *154*, 1105–1115.

221. Lehner, A.; Dardelle, F.; Soret-Morvan, O.; Lerouge, P.; Driouich, A.; Mollet, J.C. Pectins in the cell wall of *Arabidopsis thaliana* pollen tube and pistil. *Plant Signal. Behav*. **2010**, *5*, 1282–1285.
222. Anderson, J.R.; Barnes, W.S.; Bedinger, P. 2,6-Dichlorobenzonitrile, a cellulose biosynthesis inhibitor, affects morphology and structural integrity of petunia and lily pollen tubes *J. Plant Physiol.* **2002**, *159*, 61–67.
223. Whitney, S.E.C.; Wilson, E.; Webster, J.; Bacic, A.; Reid, J.S.G.; Gidley, M.J. Effects of structural variation in xyloglucan polymers on interactions with bacterial cellulose. *Am. J. Bot*. **2006**, *93*, 1402–1414.
224. Pena, M.J.; Ryden, P.; Madson, M.; Smith, A.C.; Carpita, N.C. The galactose residues of xyloglucan are essential to maintain mechanical strength of the primary cell walls in *Arabidopsis* during growth. *Plant Physiol.* **2004**, *134*, 443–451.
225. Nguema-Ona, E.; Andeme-Onzighi, C.; Aboughe-Angone, S.; Bardor, M.; Ishii, T.; Lerouge, P.; Driouich, A. The reb1-1 mutation of *Arabidopsis*: Effect on the structure and localization of galactose-containing cell wall polysaccharides. *Plant Physiol*. **2006**, *140*, 1406–1417.
226. Zabotina, O.A.; van de Ven, W.T.; Freshour, G.; Drakakaki, G.; Cavalier, D.; Mouille, G.; Hahn, M.G.; Keegstra, K.; Raikhel, N.V. *Arabidopsis XXT5* gene encodes a putative alpha-1,6-xylosyltransferase that is involved in xyloglucan biosynthesis. *Plant J.* **2008**, *56*, 101–115.
227. Gille, S.; Pauly, M. *O*-acetylation of plant cell wall polysaccharides. *Front. Plant Sci.* **2012**, *3*, doi:10.3389/fpls.2012.00012.
228. Pena, P.J.; Kong, Y.; York, W.S.; O'Neill, M.A. A galacturonic acid-containing xyloglucan is involved in *Arabidopsis* root hair tip growth. *Plant Cell* **2012**, *24*, 1–14.
229. Wang, T.; Zabotina, O.; Hong, M. Pectin-cellulose interactions in the *Arabidopsis* primary cell wall from two-dimensional magic-angle-spinning solid-state nuclear magnetic resonance. *Biochemistry* **2012**, *51*, 9846–9856.
230. Vogler, H.; Draeger, C.; Weber, A.; Felekis, D.; Eichenberger, C.; Routier-Kierzkowska, A.L.; Boisson-Dernier, A.; Ringli, C.; Nelson, B.J.; Smith, R.S.; *et al*. The pollen tube: A soft shell with a hard core. *Plant J.* **2012**, doi:10.1111/tpj.12061.

© 2013 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/).

Plant Growth Regul
DOI 10.1007/s10725-014-9919-7

ORIGINAL PAPER

Kiwi fruit PMEI inhibits PME activity, modulates root elongation and induces pollen tube burst in *Arabidopsis thaliana*

Florence Paynel · Christelle Leroux · Ogier Surcouf · Annick Schaumann · Jérôme Pelloux · Azeddine Driouich · Jean Claude Mollet · Patrice Lerouge · Arnaud Lehner · Alain Mareck

Received: 4 November 2013 / Accepted: 20 March 2014
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2014

Abstract Pectins are major components of primary cell wall that play a crucial role in plant development. After biosynthesis, pectins are secreted in the cell wall by Golgi-derived vesicles under a highly methylesterified form and are de-methylesterified by pectin methylesterases (PME). It is hypothesized that PME might be regulated by pectin methylesterase inhibitor (PMEI). In this paper, we show by isoelectric focalisation and subsequent zymogram that kiwi PMEI was able to inhibit Arabidopsis PME activity by forming a complex. The complexes were stable under a wide range of ionic strength and pH. Moreover, PMEI might be able to form a complex with basic PMEs including three PMEs strongly expressed in root and four PMEs expressed in pollen grains. Finally, exogenous treatment with kiwi PMEI was able to reduce the activity of cell wall resident PMEs with persistent effects such as an increase of the root growth and a dramatic effect on pollen tube stability.

Keywords Pectin · Pectin methylesterase · Pectin methylesterase inhibitor · Pollen · Root growth · Arabidopsis

Abbreviations

HG	Homogalacturonan
IEF	Isoelectric focalisation
PME	Pectin methylesterase
PMEI	Pectin methylesterase inhibitor
RG-I	Rhamnogalacturonan-I
RG-II	Rhamnogalacturonan-II

Arnaud Lehner and Alain Mareck have equal contribution of the senior authors.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10725-014-9919-7) contains supplementary material, which is available to authorized users.

F. Paynel · C. Leroux · O. Surcouf · A. Driouich · J. C. Mollet · P. Lerouge · A. Lehner (✉) · A. Mareck
Laboratoire de Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale (Glyco-MEV) EA 4358, Normandy University, University of Rouen, Institut de Recherche et d'Innovation Biomédicale, 76821 Mont-Saint-Aignan, France
e-mail: arnaud.lehner@univ-rouen.fr

A. Schaumann
UMR-CNRS 6270, Normandy University, University of Rouen, Institut de Recherche et d'Innovation Biomédicale, 76821 Mont-Saint-Aignan, France

J. Pelloux
Laboratoire Biologie des Plantes et Innovation (BIOPI) EA3900, University of Picardie Jules Verne, 33 Rue St Leu, 80039 Amiens, France

Introduction

Pectins are major components of the primary cell wall in eudicot species. Pectins are complex polysaccharides consisting of homogalacturonan (HG), rhamnogalacturonan-I (RG-I), rhamnogalacturonan-II (RG-II), and xylogalacturonan (Vincken et al. 2003; Fry 2011). HG is a polymer consisting of repeating units of (1,4)-α-D-GalA that is synthesized in the Golgi apparatus and deposited in the cell wall in a highly methylesterified form. De-methylesterification of HGs is catalyzed in the cell wall by a large family of enzymes called pectin methylesterases (PME, E.C.3.1.1.11; CAZy group CE8) releasing in the process methanol and protons (Moustacas et al. 1991). Active PME may work in two different ways: (1) Upon

Published online: 28 March 2014

block-wise action : the blocks of de-methylesterified HG can interact with Ca^{2+} promoting the formation of the so-called 'egg-box' structure, thereby affecting the apoplastic pH and the mechanical and biochemical properties of the cell wall; (2) upon random de-methylesterified action on HG: this action pattern does not permit the interaction with Ca^{2+} but HG may then become the target for pectin-degrading enzymes, such as polygalacturonases, affecting the texture and rigidity of the cell wall (Micheli 2001). Thus, PMEs play major roles in the remodelling of pectins *in muro* (Pelloux et al. 2007). The degree of pectin methylesterification is implicated in the control of the cell wall physical properties during elongation in pollen tubes (Parre and Geitmann 2005; Jiang et al. 2005; Tian et al. 2006) and during the hypocotyl growth (Derbyshire et al. 2007; Pelletier et al. 2010). PMEs have also been involved in cambial cell differentiation and determination of fibre length in trees (Micheli et al. 2000; Siedlecka et al. 2008), microsporogenesis (Lacoux et al. 2003; Francis et al. 2006), fruit maturation (Eriksson et al. 2004; Deytieux-Belleau et al. 2008) and organ initiation (Peaucelle et al. 2011). Moreover, numerous studies have shown that PMEs are implicated in plant defence (Lionetti et al. 2007; Osorio et al. 2008, 2011).

The Arabidopsis genome contains 66 putative PMEs. A part of these PMEs are called pre-pro-proteins, in which the mature active part of the protein (PME domain) is preceded by an N-terminal extension region (PRO region) showing similarities with PME inhibitors (PMEI; Micheli 2001). Based on the presence or absence of this PMEI domain, PME have been classified in two groups: group 1, PMEs that do not have a PMEI domain and group 2, PMEs that contain from 1 to 3 PMEI domains (Tian et al. 2006). It is generally hypothesized that the PRO region is cleaved during the maturation of PMEs. Consequently, PMEs lacking this PRO region (M_W comprised between 30 and 40 kDa) are expected to be found in the cell wall (Micheli 2001). Wolf et al. (2009) have shown that the PRO region of the group 2 PMEs regulated the release of the mature PME from the Golgi apparatus. The PRO region may also play an auto-inhibitory role during maturation, in order to inactivate the PME that are carried together with HG in the secretory vesicles (Bosch et al. 2005).

In addition to the possible auto-inhibitory function of the PRO regions, specific PMEIs have been identified and purified from kiwi fruit flesh (Camardella et al. 2000) or by using heterologous system (Wolf et al. 2003; Lionetti et al. 2007). These proteins are able to inhibit in vitro PME activities (Wolf et al. 2003; Raiola et al. 2004). Overexpressed PMEI-1 and PMEI-2 from Arabidopsis pollen can form in vivo stable complexes with two apoplastic PMEs when targeted in cell-wall from 6-week Arabidopsis plants (Lionetti et al. 2007). In tomato fruit, a complex between one isoform of fruit PME and one isoform of fruit PMEI has been purified and characterized (Reca et al. 2012).

PMEIs belong to a very large family representing up to 74 genes in Arabidopsis. Because of the strong similarity between PMEI and invertase inhibitors, most of these genes are putative PMEIs. Even if the role of PMEIs during plant development is poorly documented, the implication of PMEIs in the control of the cell shape and cell wall plasticity during cell elongation has been studied during the emergence of primordia in the shoot apical meristem (Peaucelle et al. 2008) and during pollen grain germination and pollen tube growth (Zhang et al. 2010; Woriedh et al. 2013). Pollen tubes, a single cell with a fast polarized tip growth and a massive cell wall secretion, represent a good model to understand the molecular mechanism related to cell wall biosynthesis and remodelling. In *Platanus acerifolia* pollen grains, the PMEI related protein Pla a1 was involved in pollen grain germination (Suarez-Cervera et al. 2005). It was shown that the PME isoform AtPPME1 and the PMEI isoform AtPMEI2, both specifically expressed in Arabidopsis pollen, physically interact, and that AtPMEI2 was able to inactivate AtPPME1 in vitro (Röckel et al. 2008). Moreover, suppression of the expression of a PMEI specifically expressed in Arabidopsis pollen tubes led to a partial male sterility due to an abnormal pollen tube growth (Zhang et al. 2010).

To gain further insight regarding the interaction between PME and PMEI, we chose to investigate whether PMEI from kiwi fruit (Balestrieri et al. 1990) was able to inhibit or modulate the activity of Arabidopsis PME in vitro and after exogenous addition. Kiwi PMEI offers the great advantage both to be easy to purify in an appreciable quantity and to inhibit several PMEs from different species in vitro. Moreover, no study has shown to our knowledge any specificity of complex formation between isoforms of PMEs and PMEIs in Arabidopsis. Here, we provide evidence that purified PMEI from kiwi fruit was able to interact with Arabidopsis PMEs with basic pI, therefore reducing the total PME activity in vitro. Bioinformatic analyses showed that seven basic PMEs contained the amino acids required for the kiwi fruit PMEI binding. Three of these proteins were found to be expressed in the elongation zone of the root and four in pollen grains. Thus, we studied whether this inhibitor was able to disturb the Arabidopsis root growth and pollen germination. The data show that exogenous treatments with purified kiwi PMEI enhanced root elongation and altered dramatically the resistance of the cell wall in the pollen tube tip region by inducing in a dose-dependent manner pollen tube burst.

Materials and methods

Plant growth

Arabidopsis thaliana (ecoptype Columbia) was grown on sterilized soil in a growth chamber with a light period of 16 h and dark period of 8 h at 200 µmol m^{-2} s^{-1} with a day/night temperature cycle of 20/16 °C with daily watering. Arabidopsis pollen grains were collected from freshly opened flowers as described by Dardelle et al. (2010).

Protein extraction and quantification

Kiwi PMEI (AcPMEI, accession number P83326) was purified according to Balestrieri et al. (1990), and adapted by Dedeurwaerder et al. (2009). The degree of purity of kiwi PMEI was evaluated by electrophoresis (Fig. S1). Two major bands (arrows) of Mw 19,000 and 17,000 correspond to kiwi PMEI as confirmed by MALDI-ion Trap MS/MS analysis. The weak upper band about Mw 26,000 has failed to be characterized. Arabidopsis proteins were extracted by grinding the whole 4 week-old plants in 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.5, with 0.2 % (w/v) PVPP (PolyVinylPolyPyrrolidone) and 0.01 % (w/v) Tween 20 and 1 tablet of protease inhibitor cocktail (Roche) for 3 h at 4 °C. Cellular fragments were discarded by centrifugation at 10,000*g* for 30 min. The crude protein extract was concentrated by ultrafiltration on Amicon PM10 membranes (Millipore) in water or in 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.5, depending on the experiments. Proteins were quantified by the micromethod of Bradford (Bradford 1976), with the Biorad kit and bovine serum albumin as a standard.

PME activity assay

PME activity was measured using the alcool oxydase method according to Klavons and Bennett (1986). One IU of PME activity induces the production of 1 µmol of methanol per min. Orange peel PME (Sigma) was solubilised in water, ultra-filtered on Amicon PM10 membranes and assayed for protein content and PME activity. The effect of kiwi PMEI on PME activity (orange peel and Arabidopsis proteins) was carried out by incubating with increasing concentrations of kiwi PMEI for 30 min at 25 °C in 40 µL prior to the measurement of the PME activity. The assay without addition of the PMEI was referred as 100 % activity. To determine the effects of NaCl and pH on the degree of inhibition of the kiwi PMEI on PME, the 100 % activity was evaluated by pre-incubation of the PME with the corresponding NaCl concentration or pH value without addition of PMEI. The different pHs were adjusted with 0.1 M citrate buffer (pH 5.5), 0.1 M phosphate buffer (pH 6.6 and 7.6) and 0.1 M Tris–HCl buffer (pH 8.6 and 9.8). Data are means of 3–6 independent replicates.

Electrophoresis and western-blot

Isoelectric focalisation (IEF) was performed on ultrathin polyacrylamide slab gels (0.3 mm) with 3.5–10.0 pH range (Pharmalytes) in 5 % acrylamide according to the manufacturer's procedure with a Multiphor II system (LKB-Pharmacia). The pH gradient was measured with a contact electrode (pH Inlab 426, VWR International), along a central gel strip. Samples (20 µL) were loaded at the anodic side with an applicator. After electrophoresis, gels were washed for 15–30 min in 20 mM Tris–HCl pH 8.5, 5 mM EDTA. The gels were then submitted to protein fixation for 60 min in 10 % (v/v) acetic acid, 20 % (v/v) ethanol before Coomassie R-250 or silver (Blum et al. 1987) staining. The dark background observed with silver staining could be due to interactions between proteins and ampholytes.

Western blots were carried out after passive diffusion. Briefly, gels were washed and covered with a 0.2 µm PVDF membrane (Bio-Rad) and 8 Watman-1 M sheets imbibed with water. Sandwiches were maintained by pressing with a heavy glass plate and allowed to transfer overnight at 4 °C. Blots were incubated for 10 min in 10 % (v/v) acetic acid, 20 % (v/v) ethanol. After four washes in water, blots were treated for 2 h with the specific flax anti PME3 antibody (dilution 1/200; Guénin et al. 2011) and for 1 h with peroxidase-labelled goat anti-rabbit conjugate (1/3,000; Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France), adapted from Towbin et al. (1979). Immunolabelling was visualized with 4-chloro-1-naphtol (Sigma) as a substrate.

PME zymogram

After isoelectric focalisation, gels were washed for 15–30 min in 20 mM Tris–HCl pH 8.5, 5 mM EDTA. Activity of PME was monitored in gel (zymogram) by using a sandwich of 1 % (w/v) citrus pectin with a degree of methylesterification of 85 % (Sigma)—1 % (w/v) agar according to Bertheau et al. (1984). The sandwich was incubated for 1 h at 25 °C and the de-methylated pectins resulting from PME activities were precipitated with 0.1 M malic acid and stained by 0.02 % (w/v) ruthenium red.

Sequence alignments

PME catalytic domain sequences were aligned using ClustalW (Thomson et al. 1994) with the following

parameters: PAM protein weight matrix, pairwise gap opening/extension penalties of 10/0.1, and multiple alignment gap opening/extension penalties of 10/0.05.

External application of kiwi PMEI on Arabidopsis roots

The effect of PMEI on root elongation was performed on roots of 10-days old seedlings. After sterilization and stratification of the seeds, the plates were maintained vertically for 10 days in a growth chamber with a light period of 16 h (200 µmol m^{-2} s^{-1}) and dark period of 8 h. Day/night cycles were at 20 and 16 °C, respectively. Kiwi PMEI or boiled kiwi PMEI (30 min at 100 °C) were mixed with 10 µL of lukewarm agarose (52 µM final concentration), and applied 1 mm away from the root tips. The growth of at least 40 roots was evaluated for the two conditions by measuring the length of the roots after 0, 2, 6 and 10 days of treatment. The results are the mean ± standard error of three independent experiments.

External application of kiwi PMEI during pollen grain germination

Pollen grains were collected by submerging forty freshly opened flowers in the liquid germination medium described by Boavida and McCormick (2007). After a brief agitation to release the pollen grains from the anthers, the flowers were removed with tweezers and the pollen grains were concentrated by centrifugation. Pollen grains were suspended in 720 µL of germination medium and 90 µL were transferred in a well of 96-well plate corresponding to the density of pollen grains from five flowers. 10 µL of water or kiwi PMEI (4, 10 and 20 µM) were added to the germination medium. Pollen grains and pollen tubes were grown in the dark at 22 °C without any agitation for 6 h (Dardelle et al. 2010). Samples were observed under bright-field with a Leica DLMB microscope equipped with a Leica DFC300FX camera. Pollen tube length, the rates of pollen germination and pollen tube burst were measured using ImageJ (Abramoff et al. 2004).

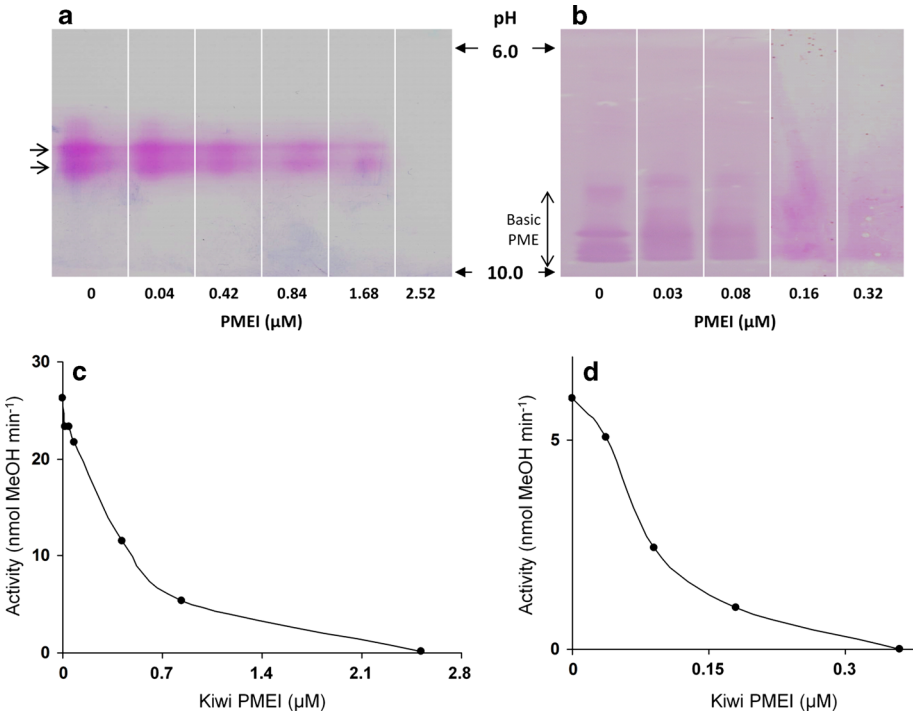


Fig. 1 Inhibition of PME by increasing concentrations of kiwi PMEI. PME activity was determined after IEF separation followed by zymogram (**a**, **b**) or after enzymatic assay (**c**, **d**) using PME either from orange peel (**a**, **c**) or from Arabidopsis proteins (**b**, **d**). Orange peel PME (1.8 µg/1.125 µM) and Arabidopsis proteins (14 µg) were pre-incubated in a volume of 40 µL for 30 min at 25 °C with increasing concentrations of kiwi PMEI and analysed with the two methods. *Arrows* indicate the two detected isoforms for the orange peel PME (**a**). PME activity was determined by the alcohol oxidase assay with (**c**) PME from orange peel and (**d**) PME from Arabidopsis proteins. Values are the mean of 4–6 independent experiments

Statistical analysis

Data were analyzed by the Student t test for statistical significance by ANOVA ($P < 0.05$) using QuickCalc (GraphPad Inc.) or Statistica (StatSoft Inc.) softwares.

Results

Orange and Arabidopsis PME activities are inhibited by kiwi PMEI

Zymogram was carried out for studying inhibition of PME from Arabidopsis by kiwi PMEI. As a control, the inhibition assay was also carried out on orange peel PME, a commercially available esterase. After isoelectrofocusing (IEF) and zymogram, orange peel PME showed two distinct bands with a pI close to 8.5 without addition of PMEI (Fig. 1a). In Arabidopsis protein extract, at least six bands with a basic pI corresponding to the different active PME isoforms were detected (Fig. 1b). These bands may correspond to six isoforms of PME from group 2 with a basic pI (Table 1). Among them, one of the isoforms can be attributed to the activity of AtPME3 (At3g14310) with a pI of 9.6 (Guénin et al. 2011). When commercial orange peel PME (Fig. 1a–c) and Arabidopsis proteins (Fig. 2b, d) were incubated with increasing concentrations of purified kiwi PMEI, a gradual reduction of PME activity was observed in a PMEI dose-dependent way as shown by both the decrease of the ruthenium red staining intensity of the de-methylesterified HG in the zymogram (Fig. 1a, b) and the decrease of methanol released from the methylesterifed HG substrate (Fig. 1c, d).

Table 1 pI values of the catalytic domain of the basic PME from group2 of Arabidopsis

PME	Locus	pI of the catalytic domain
AtPME2	At1g53830	8.9
AtPME3	At3g14310	9.6
AtPME6	At1g23200	9.4
AtPME13	At2g26450	8.9
AtPME16	At2g43050	9.6
AtPME18	At1g11580	9.2
AtPME19	At1g11590	9.0
AtPME21	At3g05610	8.5
AtPME23	At3g06830	9.2
AtPME24	At3g10710	9.8
AtPME26	At3g14300	9.3
AtPME28	At5g27870	7.8
AtPME30	At3g27980	9.8
AtPME34	At3g49220	9.5
AtPME35	At3g59010	9.2
AtPME36	At3g60730	9.2
AtPME37	At3g62170	9.4
AtPME39	At4g02300	9.0
AtPME44	At4g33220	9.2
AtPME45	At4g33230	9.3
AtPME46	At5g04960	9.3
AtPME58	At5g49180	9.3
AtPME61	At5g53370	9.2

Proteins are named according to Magrane and the UniProt consortium (2011). pI has been calculated using the Compute pI/Mw tool (Bjellqvist et al. 1993; Gasteiger et al. 2005) available on the ExPASy Resource Portal (http://www.expasy.org/)

Basic PME and kiwi PMEI can form a detectable complex on gel

Staining of IEF of kiwi PMEI with silver (Fig. 2b) and Coomassie blue (Fig. 2g) revealed a major band in the acidic region around pH 3.7. Some other bands were visible in the middle of track b. However, their importance was reinforced because of the sensitivity of the silver staining. These bands were under the detection limit of the Coomassie staining where the purification degree of kiwi PMEI appeared rather correct (Fig. 2g). As previously shown, Arabidopsis protein extracts showed at least six bands on zymogram (Fig. 2a) corresponding to some of the basic form of PME listed in the Table 1. Silver staining presented here (Fig. 2b–d) has been developed until appearance of proteins in the basic area where PME activity migrated. It mainly shows a band at pI 9.6, corresponding to AtPME3 (Guénin et al. 2011). Other basic PMEs were in too low amount to be revealed by silver or Coomassie staining (Fig. 2c, h). After pre-incubation with kiwi PMEI the basic PMEs were not detected with silver staining (Fig. 2d). In contrast, a new band in the neutral region of the pH gradient (pI 6.2) appeared (Fig. 2f, i). That band with a pI of 6.2, visible when PME activity was completely lost, corresponded probably to the complex formed between the basic PMEs, among them PME3, and the acidic kiwi PMEI.

Inhibition of Arabidopsis PME by kiwi PMEI is weakly affected by NaCl and pH

The condition to obtain an inhibition of 30 % of Arabidopsis PME by kiwi PMEI was established by pre-incubating at pH 7.6 an Arabidopsis protein extract containing 20×10^{-3} IU of PME activity with 0.16 µg (0.25 µM) of kiwi PMEI. Then, the same experiment was carried out with increasing concentrations of NaCl from 0 to 2 M (Fig. 3a) and a range of pH between 5.5 and 9.8 (Fig. 3b). Only weak modifications of the inhibition of the Arabidopsis PME by

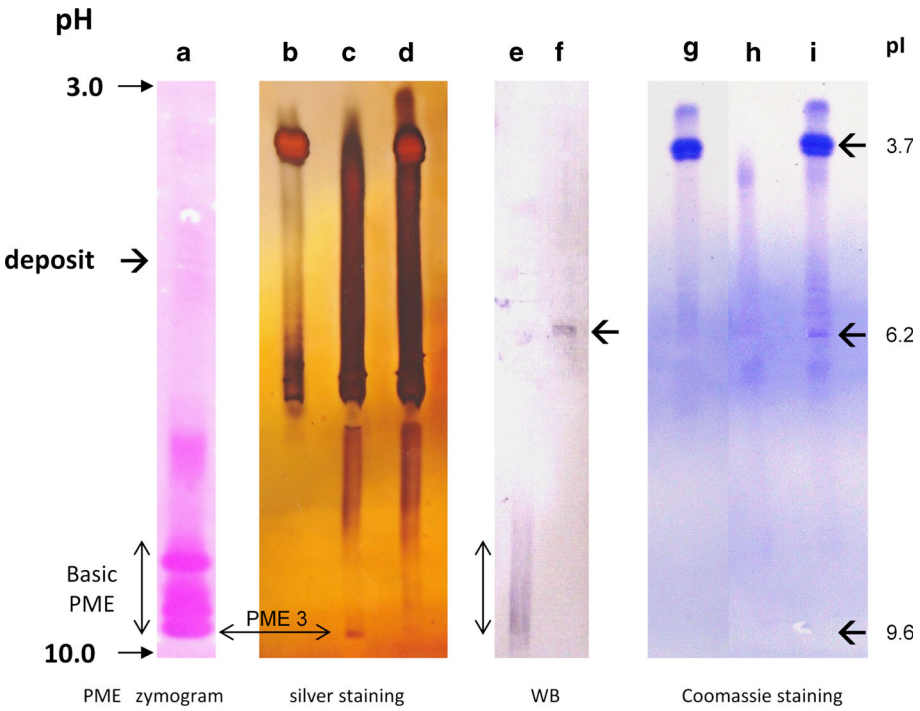


Fig. 2 Evidence of Arabidopsis PME-kiwi PMEI complex formation from IEF. **a** Zymogram of Arabidopsis proteins containing 15×10^{-3} IU of PME activity stained with ruthenium red. **b–d** Silver and **g–i** coomassie blue staining of IEF of **b**, **g** 16 µM kiwi PMEI, **c**, **h** arabidopsis proteins containing 15×10^{-3} IU of PME activity and **d**, **i** pre-incubated Arabidopsis proteins containing 15×10^{-3} IU of PME activity in a volume of 40 µL with 16 µM of kiwi PMEI for 30 min at 25 °C. **e**, **f** AtPME3 detection by Western blot of IEF with the flax anti-AtPME3 antibody in **e** Arabidopsis proteins containing 15×10^{-3} IU of PME and **f** pre-incubated Arabidopsis proteins containing 15×10^{-3} IU of PME activity in a volume of 40 µL with 16 µM of kiwi PMEI for 30 min at 25 °C. Interesting protein bands are highlighted with *arrows*

the kiwi PMEI were observed. This inhibition ranged between 30 and 45 % with NaCl, and between 20 and 30 % in the range of pH tested, suggesting that the probable formation of a complex between basic PMEs and kiwi PMEI was only slightly affected in all the conditions and that this complex was particularly stable in vitro.

Expression pattern of the basic PME from group 2 in Arabidopsis

The expression profile of the basic PME from group 2 was studied using the Genevestigator microarray database (Zimmermann et al. 2004). The cluster heat map generated by Genevestigator was confronted to the main publications depicting the expression of PMEs in pollen (Qin et al. 2009), root (Brady et al. 2007) and during silique development (Louvet et al. 2006). Generated data were totally similar to those found in the literature cited above. Figure 4 summarized the expression patterns with a focus on inflorescence and root tissues. Among the 23 basic PMEs from group 2, 17 are expressed in vegetative tissues and six of them are specifically expressed in pollen (AtPME13, 21, 23, 28, 37 and 45). Six basic PMEs from group 2 are ubiquitously expressed in all the vegetative tissues of Arabidopsis (AtPME 3, 18, 34, 35, 44 and 61) with a strong expression in root for PME 3 and 18 (Fig. 4). Four PMEs are mainly expressed in root tissues (AtPME 2, 16, 24 and 46) whereas the seven others are mainly expressed in seed or during silique development (AtPME 6, 19, 26, 30, 36, 39 and 58).

Which basic PME can structurally interact with kiwi PMEI?

The interaction of the tomato PME (PME1; accession number P14280), ortholog of AtPME3, and kiwi PMEI was studied by crystallography and the amino acids implicated in the formation of the complex PME-PMEI have been determined (Di Matteo et al. 2005) and are highlighted in black in Fig. 5. In order to assess which of the basic PMEs from group 2 were able to form a complex with the PMEI from kiwi fruit, the 23 sequences of the PME catalytic domain of the basic PMEs and the orange peel PME were aligned with the catalytic domain of the tomato PME. The results are presented in the Fig. 5 for vegetative and pollen PMEs, respectively. It is worth to note that none of the

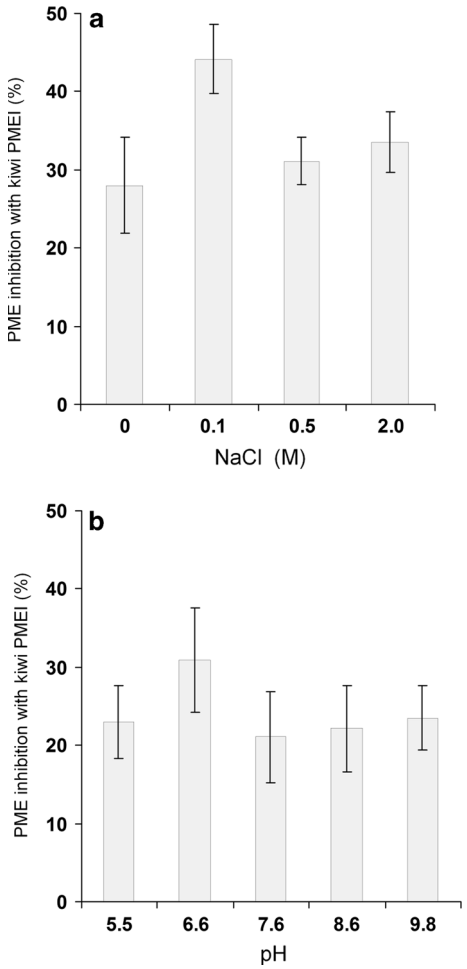


Fig. 3 Stability of Arabidopsis PME-kiwi PMEI complex treated with increasing **a** concentrations of NaCl and **b** pH values. Values are expressed as % compared to 100 % PME activity obtained without the addition of kiwi PMEI in the corresponding NaCl and pH conditions. Arabidopsis proteins containing 20×10^{-3} IU were pre-incubated in a volume of 40 µL for 30 min at 25 °C with 0.25 µM of kiwi PMEI in the conditions of NaCl and pH. In standard conditions, the inhibition of 20×10^{-3} IU of Arabidopsis PME activity with 0.25 µM of kiwi PMEI was 35 %. Values are the means of at least three independent experiments

basic PMEs from the group 1 contained the amino acids required for the interaction with the kiwi fruit PMEI (not shown).

Among the 17 basic PMEs from group 2 mainly expressed in vegetative tissues, three PMEs showed a strong homology with the tomato and orange peel PMEs (Fig. 5). Alignments between the tomato and orange peel PMEs and AtPME3, AtPME2, AtPME18 showed that all the amino acids implicated in the contact and interaction between the tomato PME and kiwi PMEI are conserved in orange peel PME, AtPME3 and AtPME2 excepted for Ala_{192} and Gly_{296}. Interestingly, PME 2, 3 and 18 are strongly expressed in the root and particularly in the elongation zone (Fig. 5).

Four out of the six basic PMEs expressed in pollen showed a strong similarity with the tomato PME (Fig. 5). AtPME21 and AtPME28 contained identical or similar amino acids at the binding sites with the PMEI, excepted for Arg_{50} for AtPME28. The two other pollen PMEs, AtPME13 and 45 had also conserved the main binding sites except for Thr_{78}, Arg_{81}, Val_{88} and Asn_{190} (Fig. 5).

Effect of exogenous treatment with kiwi PMEI on the germination of Arabidopsis pollen grains

Arabidopsis pollen grains were placed in a liquid germination medium supplemented with PMEI from kiwi fruit. In control conditions, 63.0 ± 3.9 % of the pollen grains were germinated after 6 h of culture and 10.0 ± 7.1 % of the tubes had burst. When pollen grains were placed in increasing concentrations of PMEI, the percentages of burst tubes increased gradually and reached 85.0 ± 1.7 % at a concentration of 20 µM of PMEI (Fig. 6).

Effect of exogenous treatment with kiwi PMEI on root growth

Effect of exogenous kiwi PMEI treatment was further investigated on the root growth of 10-days old plants. Heat-inactivated or native kiwi PMEI were deposited at the root tip and seedlings were allowed to grow for 10 days. The length of the growing root sections between two measurements is presented in Fig. 7. The effect of PMEI treatment on the root length was not significant during the first 2 days and started to be significant between 2 and 6 days. Between 6 and 10 days, the effect was more important and showed that the root grew faster, 28.5 ± 6.2 % increases compared to the control. The effect of PMEI appeared amplified with time. No detectable effect was visible concerning hypocotyl length, rosette appearance, leaves number, size or shape (Fig. 7).

Discussion

The present study aimed to investigate the inhibition of Arabidopsis PME with kiwi PMEI and the resulting effects on root growth and pollen germination. PME inhibition by PMEI has been mainly studied by enzymatic assays (Balestrieri et al. 1990) and by crystallography (Di Matteo et al. 2005). Additional data were reported in Arabidopsis by modifying the level of expression of PMEI (Lionetti et al. 2007; Röckel et al. 2008; Zhang et al. 2010; Peaucelle et al. 2008). Our data showed that zymogram is particularly adapted to study the interactions between PME and PMEI in a complex system of isoforms. To our knowledge, only two studies have used the zymogram method for the PME

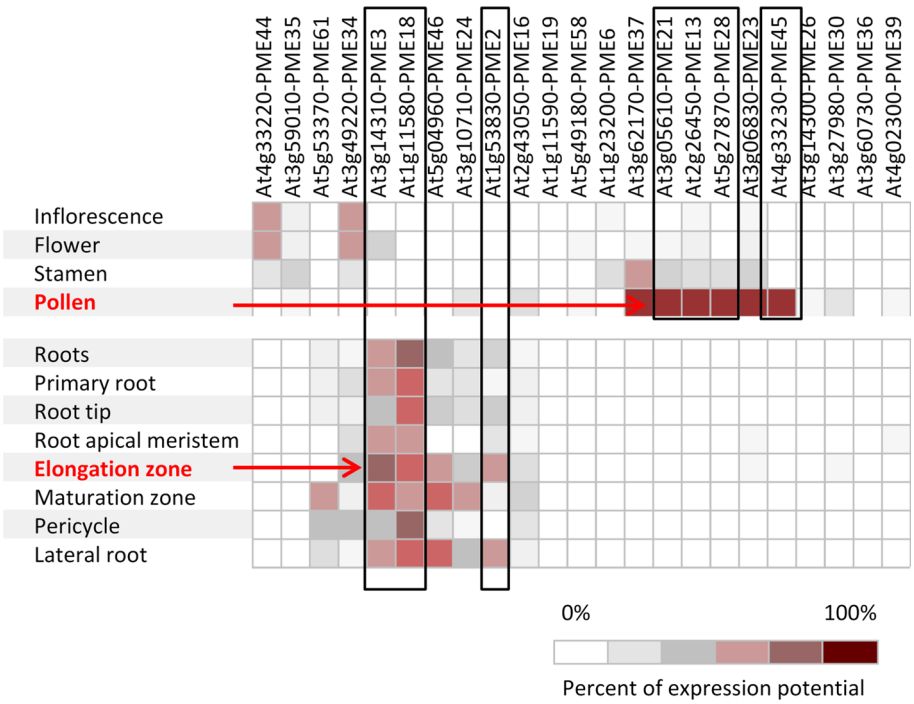


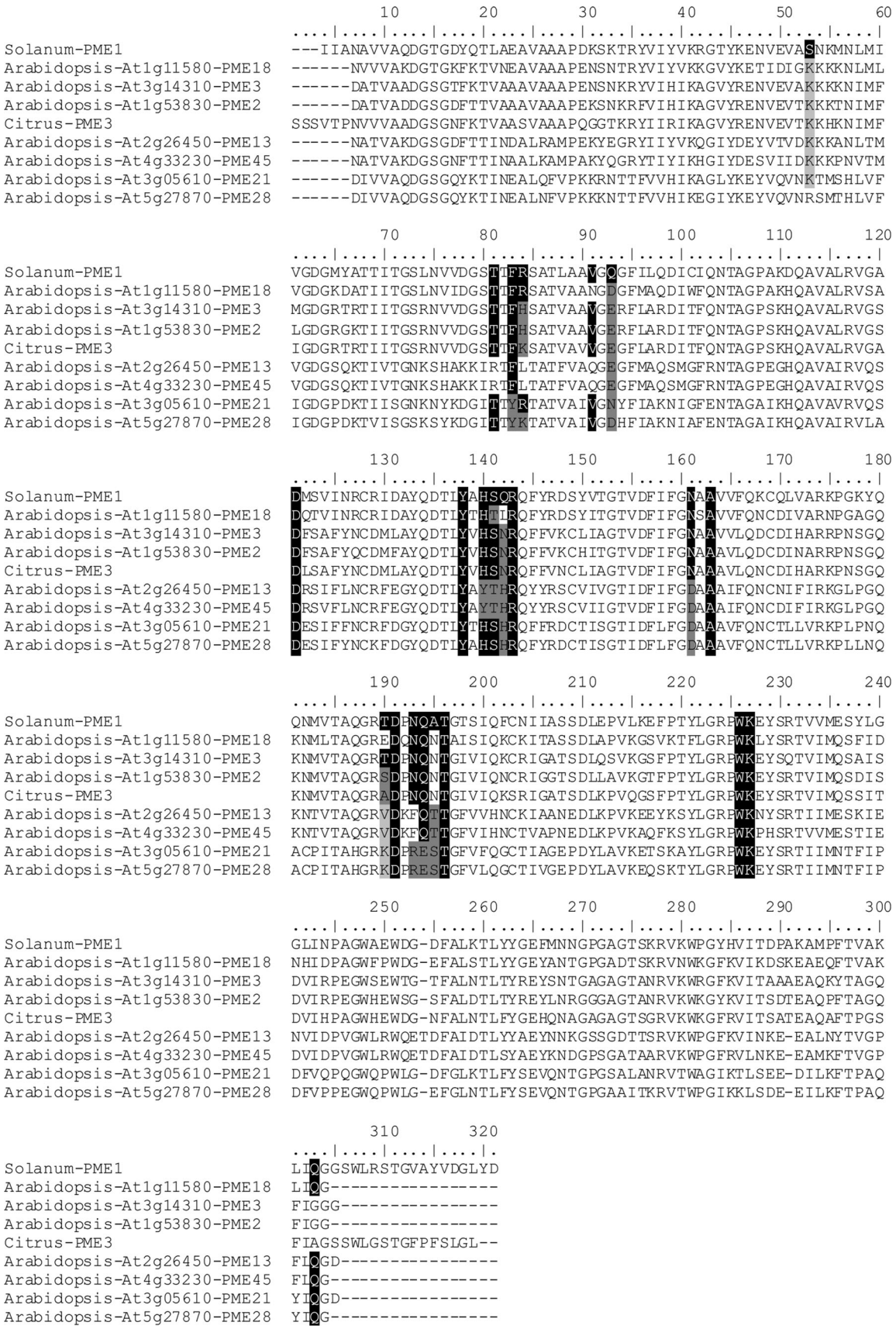
Fig. 4 Expression in root and inflorescence of Arabidopsis basic PMEs from group 2 by Genevestigator AtPME relative expression heat map obtained with Genevestigator (Zimmermann et al. 2004; Hruz et al. 2008) was similar to the transcriptomic data obtained for roots (Brady et al. 2007) and pollens (Qin et al. 2009)

characterization in Arabidopsis (Richard et al. 1994; Guénin et al. 2011). At least 6 PME isoforms, including AtPME3, (pI 9.6, M_W 33,000), were reported in 4-days old etiolated hypocotyls (Guénin et al. 2011) as observed in our study with 4-weeks-old plants (Fig. 1c). After incubation with the kiwi PMEI, a strong inhibition was revealed by the gradual disappearance of the staining on the zymogram as well as for the orange peel PME and the flax PME (data not shown) or for Arabidopsis PMEs. The six main basic isoforms disappeared progressively and uniformly from the profile in Arabidopsis after incubation with the PMEI whereas a new band appeared at pI 6.2. It might correspond to the complex formed between the basic PMEs (among them the PME3) and the acidic kiwi PMEI. Bands of other AtPME isoforms that disappear from the zymogram after kiwi PMEI treatment indicate that other complexes, faintly visible on the profile, were formed.

The inhibition between AtPMEs and kiwi PMEI is only slightly affected by ionic strength or pH as observed for the inhibition of the kiwi fruit PME by its inhibitor (Ciardiello et al. 2007). The inhibition of AtPME activity by PMEI was similar when proteins were pre-incubated in the standard condition than in 2 M NaCl medium. The optimum conditions that promote the formation of the complex between PME and PMEI were 0.1 M NaCl and pH 6.6. Interestingly, these conditions are close to what is generally found in the cell wall. When no NaCl was added to the culture medium, apoplastic Na^+ concentration was estimated to 80 mM in leaves of *Sarcobatus vermiculatus*, and to 150 mM when 100 mM of NaCl was added to the medium (James et al. 2006). Moreover, apoplastic pH was reported to be comprised between 5.3 and 6.7 (Gao et al. 2004). In conclusion, our findings show that the complex is stable in a large range of NaCl concentrations and pH values in vitro. These properties prevent any complex dissociation in ionic strength and pH conditions compatible with physiological survival of the apoplast and thus of the cell. If the separation of PME/PMEI complexes seems impossible *in muro* without modification of one (or the two) protein(s), what could be the role of such persistent protein dimers *in-muro*?

The existence of a large number of PME and PMEI isoforms in Arabidopsis, respectively 66 and 74 remains unclear. A large number of isoforms are restricted to the pollen development. Kiwi PMEI has an amino acid sequence closely related to the pollen PMEI isoforms and was able to inhibit the total PME activity present in Arabidopsis extracts and notably the activity of AtPME3. The predominant PME isoform in our extracts, AtPME3 is the ortholog of the tomato PME that was co-crystallized with kiwi PMEI in a previous study (Lionetti et al. 2007).

Fig. 5 Sequence alignments of the tomato PMEI (*Solanum*), orange ▶ peel PME (*Citrus*), three Arabidopsis PMEs expressed in the elongation zone of the root and four Arabidopsis PMEs expressed in pollen. The amino acids from the tomato PME implicated in the interaction with kiwi PMEI are boxed (Di Matteo et al. 2005). *Black, dark grey, light grey and white boxes* indicate identical, highly similar, weakly similar and non similar amino acid, respectively. Alignments were realised with ClustalW (Thomson et al. 1994) with the sequences of the pectinesterase catalytic domain


Solanum-PME1
Arabidopsis-At1g11580-PME18
Arabidopsis-At3g14310-PME3
Arabidopsis-At1g53830-PME2
Citrus-PME3
Arabidopsis-At2g26450-PME13
Arabidopsis-At4g33230-PME45
Arabidopsis-At3g05610-PME21
Arabidopsis-At5g27870-PME28

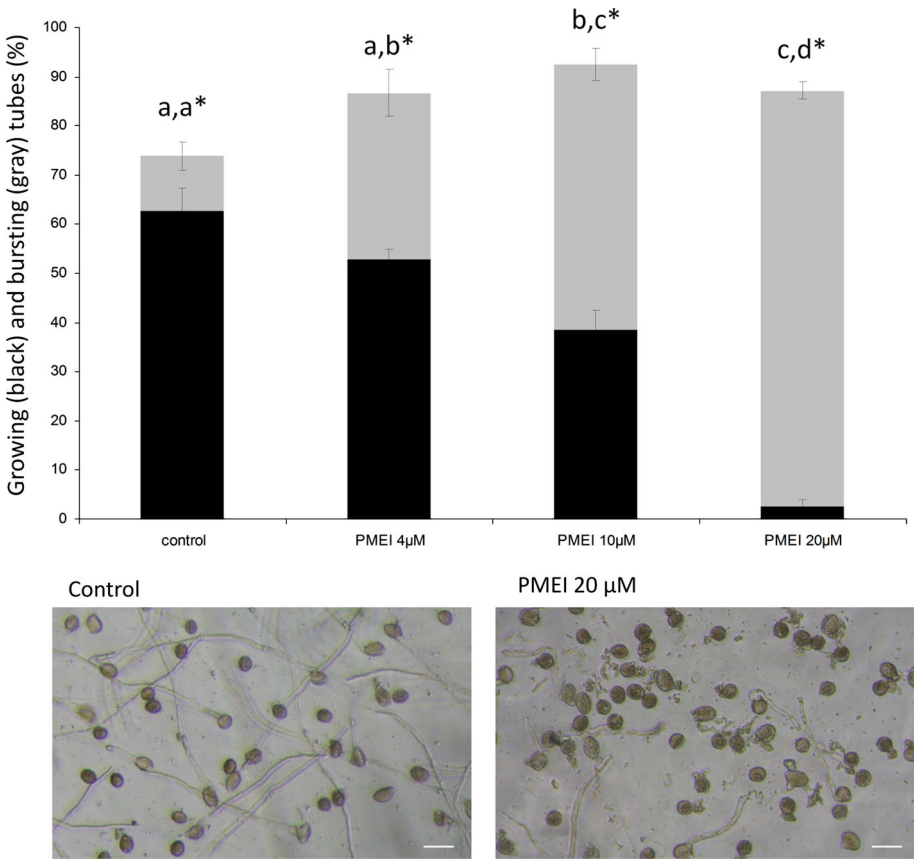


Fig. 6 Effect of kiwi PMEI on the germination rates of Arabidopsis pollen grains and pollen tube growth. Liquid germination medium contains 0 (*control*), 4, 10 and 20 µM PMEI (*upper panel*). *Black bars* represent the % of growing pollen tubes and grey bars represent the % of burst pollen tubes. *Lower panel* shows normal growing pollen tubes (control condition, *left*) and burst pollen tubes (20 µM of PMEI, *right*). Percentages are the means of three independent experiments ± SD ($n > 500$). *Different letters* indicate Student's *t* test ($P < 0.0001$) significant differences, *single letter* for the germination and the letter with *asterisk* for the burst tubes. *Scale bars* represent 50 µm

AtPME3 has high level of conservation for the amino acids necessary to establish the contact and binding with the kiwi PMEI and therefore to form the inhibiting complex.

Recent reports have documented links between cell elongation and the degree of methylesterification (DM) of pectins (Jiang et al. 2005; Derbyshire et al. 2007; Pelletier et al. 2010; Peaucelle et al. 2008). The aim of our experiments was to modulate PME activity by exogeneous application of kiwi PMEI. Studies were carried out on key development stages where elongation processes are particularly intensive. These treatments induced visible effects on Arabidopsis root growth and pollen grain germination. Treatments with exogenous PMEI on the apex of 10-day old plants induced a noticeable increase of root growth rate compared to the control. This finding indicates that PMEI has diffused effectively in the root cell-wall matrix and probably from cell to cell via the apoplast prior to trigger growth modification. To date, no report has demonstrated that PMEI might interact with membrane receptors to induce forward growth effects. Most probably, new inhibiting complexes have been formed between the diffusing PMEI and the resident active PME in the cell wall. Stretched shape, low M_W and anionic charge of kiwi PMEI are positive factors for such as diffusion. Subsequently, local inhibition of the PMEs may maintain the DM of pectin to higher levels resulting in an increase of cell wall plasticity and therefore promoting growth (Pelletier et al. 2010). In fact, Arabidopsis transgenic plants over expressing the AtPMEI-1 or AtPMEI-2 did not show any obvious phenotype but a 20 % increase of root length (Lionetti et al. 2007).

Fourteen PME among 66 are specifically expressed in pollen grains and pollen tubes of Arabidopsis. The DM of pectin in the pollen tube is often considered as a main factor regulating pollen tube elongation (Lehner et al. 2010 ; Mollet et al. 2013). Immunofluorescent labeling of partially and highly methylesterified HG on Arabidopsis pollen tubes showed a dominant localization of highly methylesterified HG at the tip and more weakly methylesterified HG back from the tip region (Dardelle et al. 2010; Chebli et al. 2012). The apical methylesterified HGs are thought to provide sufficient plasticity required for the fusion of Golgi-derived vesicles and sustaining pollen tube growth. On the other hand, de-methylesterified HGs can form ionic bonds between the negatively charged carboxyl groups of several HG and Ca^{2+} ions forming a pectate gel that may provide stiffness of the pollen tube cell wall (Geitmann and Steer 2006). Therefore, the control of PME activity in the modulation of de-methylesterification of the HG in the pollen tube cell wall is capital (Hepler et al. 2012). The

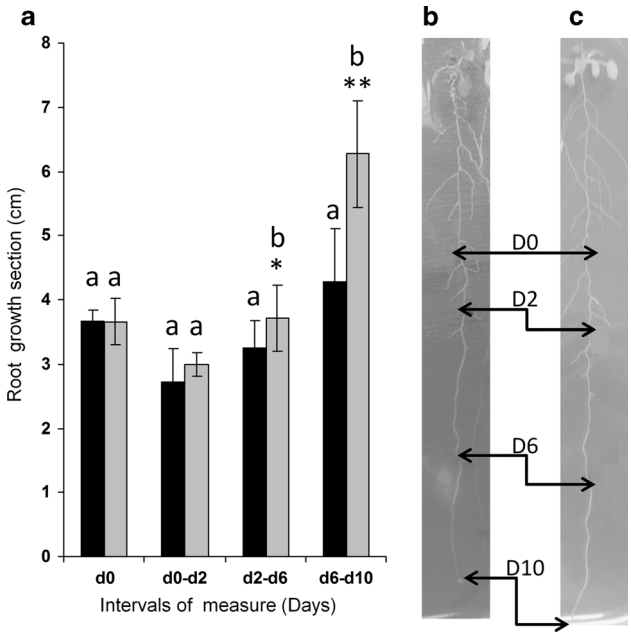


Fig. 7 Effect of kiwi PMEI on the growth of Arabidopsis roots. **a** Root growth sections (cm) of 10-days old plants were measured from day 0, just before the application of kiwi PMEI at the root tips up to day 10. *Black bars* are the control; *grey bars* represent the treatment with 52 µM kiwi PMEI. For the control assays, root tips were treated with the same amounts of boiled kiwi PMEI (30 min at 100 °C). d0 represents the average length of roots before treatments. *Different letters* indicate Student's *t* test results of the comparison of the root length for each intervals independently (*, $0.05 < P < 0.01$; **, $0.01 < P < 0.001$). **b**, **c** Two representative seedlings from the control (**b**) and the treated one (**c**). The position of the root tips after 0, 2, 6 and 10 days of treatment are labelled do, d2, d6 and d10. At least 40 plants per condition were observed. *Scale bars* = 1 cm

observation that the pollen tubes burst when PMEI is added to the germination medium, as shown in Fig. 6, reinforces the idea that the DM is regulated during pollen tube growth. The subsequent inhibition of pollen PMEs does not allow the proper formation of the pectate gel with calcium that provides the stiffness of the wall (Rounds et al. 2011). Consequently, the pollen tube wall cannot handle the turgor pressure and pollen tubes explode between the apex and sub-apical regions of the tip where PMEs are acting (Chebli et al. 2012). Similar effects were recently observed on maize pollen tubes treated with exogenous maize PMEI (Woriedh et al. 2013).

As PME are represented by a large multigenic family, their studies, by using knock out mutant approach may be compromised by compensatory effect. The use of exogenous PMEI, and particularly those of Arabidopsis, could represent a complementary alternative for elucidating the roles of PMEs in root and pollen developments.

Acknowledgments The authors are grateful to Anne Gée for her excellent technical assistance and the University of Rouen for its constant logistic helps. This work was supported by the ANR (ANR-09-BLANC-0007-01 Project GROWPEC). 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.

References

Abramoff MD, Magelhaes PJ, Ram SJ (2004) Image processing with Image. J Biophotonics Int 11:36–42

Balestrieri C, Castaldo D, Giovane A, Quagliuolo L, Servillo L (1990) A glycoprotein inhibitor of pectin methylesterase in kiwi fruit (*Actinidia chinensis*). Eur J Biochem 193:183–187

Bertheau Y, Madgidi-Hervan E, Kotoujansky A, Nguyen-The C, Andro T, Coleno A (1984) Detection of depolymerase isoenzymes after electrophoresis or electrofocusing or in titration curves. Anal Biochem 139:383–389

Bjellqvist B, Hughes GJ, Pasquali C, Paquet N, Ravier F, Sanchez JC, Frutiger S, Hochstrasser DF (1993) The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. Electrophoresis 14:1023–1031

Blum H, Beier H, Gross HJ (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. Electrophoresis 8:93–99

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

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

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. Anal Biochem 72:248–254

Brady SM, Orlando DA, Lee JY, Koch J, Dinneny JR, Mace D, Ohler U, Benfey PN (2007) A high-resolution root spatiotemporal map reveals dominant expression patterns. Science 318:801–806

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

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

Ciardiello MA, D'Avino R, Amoresano A, Tuppo L, Carpentieri A, Carratore V, Tamburrini M, Giovane A, Pucci P, Camardella L (2007) The peculiar structural features of kiwi fruit pectin methylesterase: amino acid sequence, oligosaccharide structure, and modeling of the interaction with its natural proteinaceous inhibitor. Proteins 71:195–206

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 153:1563–1576

Dedeurwaerder S, Menu-Bouaouiche L, Mareck A, Lerouge P, Guérineau F (2009) Activity of an atypical *Arabidopsis thaliana* pectin methylesterase. Planta 229:311–321

Derbyshire P, McCann MC, Roberts K (2007) Restricted cell elongation in Arabidopsis hypocotyls is associated with a reduced average pectin esterification level. BMC Plant Biol 7:31

Deytieux-Belleau C, Vallet A, Donèche B, Geny L (2008) Pectin methylesterase and polygalacturonase in the developing grape skin. Plant Physiol Biochem 46:638–646

Di Matteo A, Giovane A, Raiola A, Camardella L, Bonivento D, De Lorenzo G, Cervone F, Bellincampi D, Tsernoglou D (2005) Structural bases for the interaction between pectin methylesterase and a specific inhibitor protein. Plant Cell 17:849–858

Eriksson EM, Bovy A, Manning K, Harrison L, Andrews J, De Silva J, Tucker GA, Seymour GB (2004) Effect of the colorless non-ripening mutation on cell wall biochemistry and gene expression during tomato fruit development and ripening. Plant Physiol 136:4184–4197

Francis EK, Lam SY, Copenhaver GP (2006) Separation of Arabidopsis pollen tetrads is regulated by QUARTET1, a pectin methylesterase gene. Plant Physiol 142:1004–1013

Fry SC (2011) Cell wall polysaccharide composition and covalent crosslinking. Ann Plant Rev 41:1–42

Gao D, Knight MR, Trewavas AJ, Sattelmacher B, Plieth C (2004) Self reporting Arabidopsis expressing pH and [Ca^{2+}] indicators unveil ion dynamics in the cytoplasm and the apoplast under abiotic stress. Plant Physiol 134:898–908

Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A (2005) Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: Walker JM (ed) The proteomics protocols handbook. Humana Press, Totowa

Geitmann A, Steer M (2006) The architecture and properties of the pollen tube cell wall. In: Malhó R (ed) The pollen tube. Plant Cell Monogr, vol 3. Springer, Berlin, pp 177–200

Guénin S, Mareck A, Rayon C, Lamour R, Assoumou Ndong Y, Domon JM, Sénéchal F, Fournet F, Jamet E, Canut H, Percoco G, Mouille G, Rolland A, Rustérucci C, Guerineau F, Van Wuytswinkel O, Gillet F, Driouich A, Lerouge P, Gutierrez L, Pelloux J (2011) Identification of pectin methylesterase 3 as a basic pectin methylesterase isoform involved in adventitious rooting in *Arabidopsis thaliana*. New Phytol 192:114–126

Hepler PK, Kunkel JG, Rounds CM, Winship LJ (2012) Calcium entry into pollen tubes. Trends Plant Sci 17:32–38

Hruz T, Laule O, Szabo G, Wessendorp F, Bleuler S, Oertle L, Widmayer P, Gruissem W, Zimmermann P (2008) Genevestigator V3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. Adv Bioinform 2008:420747

James JJ, Alder NN, Mühling KH, Läuchli AE, Shakel KA, Donovan LA, Richards JH (2006) High apoplastic solute concentrations in leaves alter water relations of the halophytic shrub, *Sarcobatus vermiculatus*. J Exp Bot 57:139–147

Jiang L, Yang SL, Xie LF, Puah CS, Zhang XQ, Yang WC (2005) VANGUARD1 encodes a pectin methyl-esterase that enhances pollen tube growth in the Arabidopsis style and transmitting tract. Plant Cell 17:584–596

Klavons JA, Bennett AD (1986) Determination of methanol using alcohol oxidase and its application to methyl ester content of pectins. J Agric Food Chem 34:597–599

Lacoux J, Gutierrez L, Dantin F, Beaudoin B, Roger D, Lainé E (2003) Antisense transgenesis of tobacco with a flax pectin methylesterase affects pollen ornamentation. Protoplasma 222:205–209

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

Lionetti V, Raiola A, Camardella L, Giovane A, Obel N, Pauly M, Favaron F, Cervone F, Bellincampi D (2007) Overexpression of pectin methylesterase inhibitors in Arabidopsis restricts fungal infection by *Botrytis cinerea*. Plant Physiol 143:1871–1880

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 224:782–791

Magrane M, UniProt Consortium (2011) UniProt knowledgebase: a hub of integrated protein data. *Database*. doi:10.1093/database/bar009

Micheli F (2001) Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. Trends Plant Sci 6:414–419

Micheli F, Sundberg B, Goldberg R, Richard L (2000) Radial distribution pattern of pectin methylesterases across the cambial region of hybrid aspen at activity and dormancy. Plant Physiol 124:191–199

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

Moustacas AM, Nari J, Borel M, Noat G, Ricard J (1991) Pectin methylesterase, metal ions and plant cell-wall extension. The role of metal ions in plant cell-wall extension. Biochem J 279:351–354

Osorio S, Castillejo C, Quesada MA, Medina-Escobar N, Brownsey GJ, Suau R, Heredia A, Botella MA, Valpuesta V (2008) Partial demethylation of oligogalacturonides by pectin methyl esterase 1 is required for eliciting defence responses in wild strawberry (*Fragaria vesca*). Plant J 54:43–55

Osorio S, Bombarely A, Giavalisco P, Usadel B, Stephens C, Aragüez I, Medina-Escobar N, Botella MA, Fernie AR, Valpuesta V (2011) Demethylation of oligogalacturonides by FaPE1 in the fruits of the wild strawberry *Fragaria vesca* triggers metabolic and transcriptional changes associated with defence and development of the fruit. J Exp Bot 62:2855–2873

Parre E, Geitmann A (2005) Pectin and the role of the physical properties of the cell wall in pollen tube growth of *Solanum chacoense*. Planta 220:582–592

Peaucelle A, Louvet R, Johansen JN, Höfte H, Laufs P, Pelloux J, Mouille G (2008) Arabidopsis phyllotaxis is controlled by the methyl-esterification status of cell-wall pectins. Curr Biol 18:1943–1948

Peaucelle A, Braybrook SA, Le Guillou L, Bron E, Kuhlemeier C, Höfte H (2011) Pectin-induced changes in cell wall mechanics underlies organ initiation in Arabidopsis. Curr Biol 21:1720–1726

Pelletier S, Van Orden J, Wolf S, Vissenberg K, Delacourt J, Ndong YA, Pelloux J, Bischoff V, Urbain A, Mouille G, Lemonnier G, Renou JP, Höfte H (2010) A role for pectin de-methylesterification in a developmentally regulated growth acceleration in dark-grown Arabidopsis hypocotyls. New Phytol 188:726–739

Pelloux J, Rustérucci C, Mellerowicz EJ (2007) New insights into pectin methylesterase structure and function. Trends Plant Sci 12:267–277

Qin Y, Leydon AR, Manziello A, Pandey R, Mount D, Denic S, Vasic B, Johnson MA, Palanivelu R (2009) Penetration of the stigma and style elicits a novel transcriptome in pollen tubes, pointing to genes critical for growth in a pistil. PLoS Genet 5:e1000621

Raiola A, Camardella L, Giovane A, Mattei B, De Lorenzo G, Cervone F, Bellincampi D (2004) Two *Arabidopsis thaliana* genes encode functional pectin methylesterase inhibitors. FEBS Lett 557:199–203

Reca IB, Lionetti V, Camardella L, D'Avino R, Giardina T, Cervone F, Bellicampi D (2012) A functional pectin methylesterase inhibitor protein (SolyPMEI) is expressed during tomato fruit ripening and interacts with PME-1. Plant Mol Biol 79:429–442

Richard L, Qin LX, Gadal P, Goldberg R (1994) Molecular characterization of a putative pectin methylesterase cDNA and its expression in *Arabidopsis thaliana* (L.). FEBS Lett 355:135–139

Röckel N, Wolf S, Kost B, Rausch T, Greiner S (2008) Elaborate spatial patterning of cell-wall PME and PMEI at the pollen tube tip involves PMEI endocytosis, and reflects the distribution of esterified and de-esterified pectins. Plant J 53:133–143

Rounds CM, Lubeck E, Hepler PK, Winship LJ (2011) Propidium iodide competes with Ca^{2+} to label pectin in pollen tubes and Arabidopsis root hairs. Plant Physiol 157:175–187

Siedlecka A, Wiklund S, Péronne MA, Micheli F, Lesniewska J, Sethson I, Edlund U, Richard L, Sundberg B, Mellerowicz EJ (2008) Pectin methyl esterase inhibits intrusive and symplastic cell growth in developing wood cells of Populus. Plant Physiol 146:554–565

Suarez-Cervera M, Asturias JA, Vega-Maray A, Castells T, Lopez-Iglesias C, Ibarrola I, Arilla M, Gabarayeva N, Seoane-Camba J (2005) The role of allergenic proteins Pla a 1 and Pla a 2 in the germination of *Platanus acerifolia* pollen grains. Sexual Plant Reprod 18:101–112

Thomson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTALW: improving the sensibility of progressive alignment through sequence weighting, position—specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res 22:4673–4680

Tian GW, Chen MH, Zaltsman A, Citovsky V (2006) Pollen-specific pectin methylesterase involved in pollen tube growth. Dev Biol 294:83–91

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA 76:4350–4354

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

Wolf S, Grsic-Rausch S, Rausch T, Greiner S (2003) Identification of pollen expressed pectin methylesterase inhibitors in Arabidopsis. FEBS Lett 555:551–555

Wolf S, Rausch T, Greiner S (2009) The N-terminal pro-region mediates retention of unprocessed type-I PME in the Golgi apparatus. Plant J 58:361–375

Woriedh M, Wolf S, Marton ML, Hinze A, Gahrtz M, Becker D, Dresselhaus T (2013) External application of gametophyte-specific ZmPEMI1 induces pollen tube burst in maize. Plant Reprod. doi:10.1007/s00497-013-0221-z

Zhang GY, Feng J, Wu J, Wang XW (2010) BoPMEI1, a pollen-specific pectin methylesterase inhibitor, has an essential role in pollen tube growth. Planta 231:1323–1332

Zimmermann P, Hirsch-Hoffmann M, Hennig L, Gruissem W (2004) GENEVESTIGATOR. Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. Plant Physiol 136:2621–2632

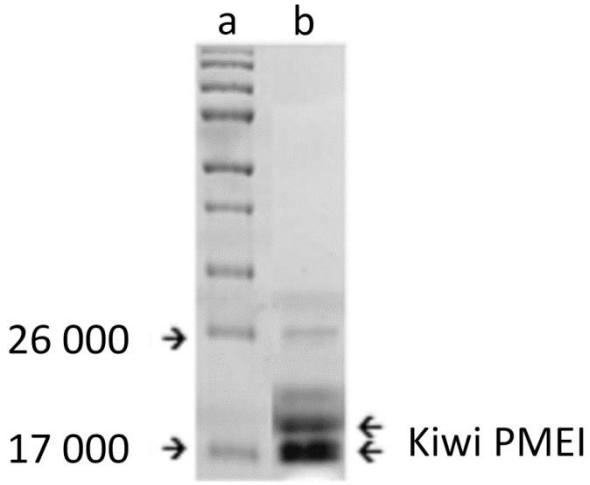


Fig S1 Electrophoresis gel of purified kiwi PMEI – (a) Molecular weight standards. (b) Purified kiwi PMEI (10 µg).

Présentations orales et posters dans des congrès :

Ces travaux m'ont permis, durant toute ma thèse, de valoriser mes résultats en les présentant lors de colloques et congrès, et ce, sous la forme de deux présentations orales en anglais et de 8 posters.

Présentations orales en Anglais :

1. **Leroux C, Bouton S, Kiefer-Meyer MC, Morvan C, Pelloux J, Driouich A, Lerouge P, Lehner A, Mollet JC.** Involvement of pectin methylesterase during imbibition and germination of *Arabidopsis* pollen grain. Journée mini-talk, Université de Rouen, Mont Saint-Aignan, France, 21 mars 2014.

2. **Leroux C, Bouton S, Kiefer-Meyer MC, Pelloux J, Driouich A, Lerouge P, Lehner A, Mollet JC.** Involvement of pectin methylesterase during imbibition and germination of Arabidopsis pollen grain. Journée Ecole doctorale Normande Biologie Intégrative, Santé, Environnement (EdNBISE), Le Havre, France, 10-11 Avril 2014.

Posters :

1. **Leroux C, Lehner A, Fournet F, Guénin S, Kiefer-Meyer MC, Pelloux J, Driouich A, Lerouge P, Mollet JC.** Involvement of two pectin methylesterases *At*PPME1 and *At*PME48 during *Arabidopsis* pollen germination. Journées du Réseau Français des Parois, Lille, France. 6-8 juin 2011.

2. **Leroux C, Lehner A, Kiefer-Meyer MC, Pelloux J, Driouich A, Lerouge P, Mollet JC.** Involvement of pectin methylesterases in *Arabidopsis* pollen imbibition and germination. Journée Ecole doctorale Normande Biologie Intégrative, Santé, Environnement, Rouen, France. 23 mars 2012.

3. **Leroux C, Lehner A, Kiefer-Meyer MC, Pelloux J, Driouich A, Lerouge P, Mollet JC.** Involvement of pectin methylesterases in *Arabidopsis* pollen imbibition and germination. 1ère journée scientifique de l'IRIB, Rouen, France. 1er juin 2012.

4. **Lehner A, Dardelle F, Leroux C, Mollet JC.** De la fleur à la graine, le fabuleux destin du pollen. 21ème édition de la Fête de la Science, Rouen, France (vulgarisation grand public). 10-14 Octobre 2012.

5. **Leroux C, Lehner A, Kiefer-Meyer MC, Pelloux J, Driouich A, Lerouge P, Mollet JC.** A new model depicting the role of PME during dehydration and germination of pollen grain. Colloque Grands Réseaux de Recherche, Rouen, France. 29-30 novembre 2012.

6. **Leroux C, Lehner A, Kiefer-Meyer MC, Pelloux J, Driouich A, Lerouge P, Mollet JC.** A new model depicting the role of PME during dehydration and germination of pollen grain. 2ème journée scientifique de l'IRIB, Rouen, France. 21 Juin 2013.

7. **Lehner A, Leroux C, Guénin S, Fournet F, Kiefer-Meyer MC, Pelloux J, Driouich A, Lerouge P, Mollet JC.** *At*PME48 encodes a pectin methylesterase involved in *Arabidopsis* pollen grain germination. XIIIth Cell Wall Meeting, Nantes, France. 7-12 Juillet 2013.

8. **Leroux C, Bouton S, Morvan C,Fournet F, Guénin S, Kiefer-Meyer MC, Mareck A, Pelloux J, Driouich A, Lerouge P, Lehner A, Mollet JC.** Decrease in PME48 activity leads to abnormal pollen germination. 23rd Congrès ICSPR2014 (International Congress on Sexual Plant Reproduction), Porto, Portugal. 13-18 Juillet 2014.

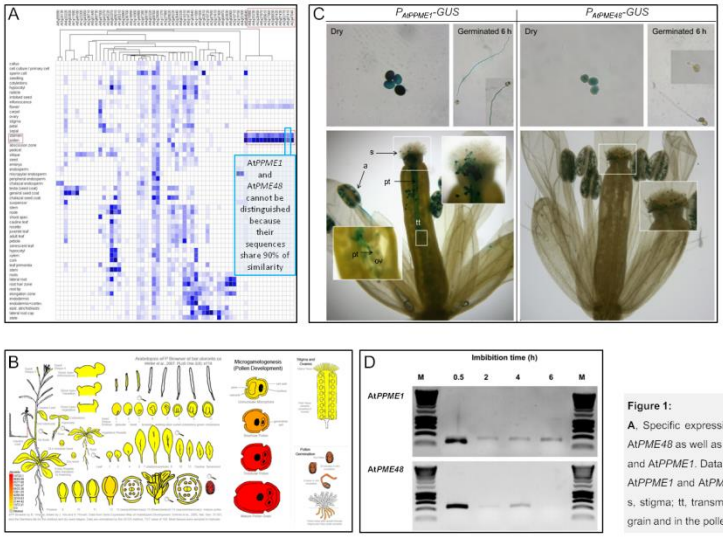
Involvement of two pectin methylesterases AtPPME1 and AtPME48 during Arabidopsis pollen germination

Leroux C[a], Lehner A[a], Fournet F[b], Guénin S[b], Kiefer-Meyer MC[a], Pelloux J[b], Driouich A[a], Lerouge P[a] & Mollet JC[a]

[a] Laboratoire Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale, UPRES-EA 4358, PRIMACEN IBiSA, IFRMP 23, Université de Rouen, 76821 Mont Saint-Aignan Cedex, France.
[b] Biologie des Plantes et contrôle des Insectes ravageurs, UPRES-EA 3900, Université de Picardie-Jules Verne, 80039 Amiens, France.

INTRODUCTION

Germination of the pollen grain on the stigma is the first step of the reproduction process. It needs a complete and rapid rehydration of the pollen which may be controlled by the variation of the level of methylesterification of pectic homogalacturonans (HG). Methylester groups are hydrophobic and they can be removed from the HGs by the action of pectin methylesterases (PMEs) [1]. The expression of two genes coding for two pollen specific PMEs (At*PPME1* and At*PME48*) have been analyzed by RT-PCR and GUS staining. Moreover, we have investigated the role of these PMEs on the pollen germination using two knock-out mutants for *PME48* and *PPME1*.



1. At*PPME1* and At*PME48* expression profile

- Among the 14 genes coding for pollen specific PME (Fig 1A), Atppme1 and Atpme48 exhibit 90% of similarity and their expression profiles cannot be distinguished on available transcriptomic databases (Fig 1B).
- At*PPME1* and At*PME48* are strongly expressed in dry pollen grains and in pollen grains rehydrated for 0.5 h (Fig 1C and D).
- At*PME48* is no longer expressed in the pollen tube after 6 h of culture whereas At*PPME1* appears to be expressed during the first 6 h of growth (Fig 1C and D).

Figure 1:
A, Specific expression of the 14 PME genes in pollen (boxed in red). 12 genes are presented as At*PPME1* and At*PME48* as well as At2g47030 and At2g47040 are too similar to be distinguished. **B**, Tissue expression of At*PME48* and At*PPME1*. Data from genevestigator and EFP browser [2,3]. **C**, In vitro and in vivo localization of the expression of At*PPME1* and At*PME48* in dry and germinated grains using GUS constructions; a, anther; pt, pollen tube; ov, ovule; s, stigma; tt, transmitting tract. **D**, mRNA expression level of At*PPME1* and At*PME48* during rehydration of pollen grain and in the pollen tube.

2. *Atppme1 and Atpme48* knock-out mutant analyses

- Germination is strongly affected in both *ppme1* and *pme48* knock-out mutants. Percentages of germination reach 40 and 10% respectively for *ppme1* and *pme48* after 24 h (Fig 2A). 90% of the wild type pollen grains have germinated after 24 h (Fig 2A).
- Rehydration of the pollen grains is slower in both *ppme1* and *pme48* knock-out mutants compared to the wild type (Fig 2B).
- Germinated pollen grains from mutants lines show frequent abnormalities : two or tree tubes emerging from the grain instead of one (Fig 2C upper panel). Elongating pollen tubes from *pme48* also show abnormal morphotype (red circle, Fig 2C, lower panel).

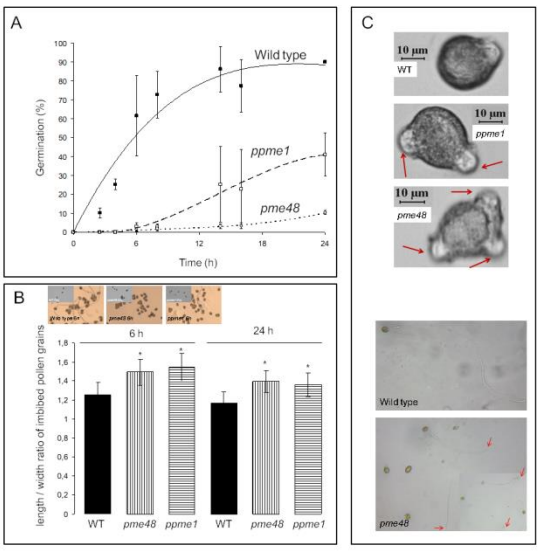


Figure 2 :
A, Germination percentages of pollen grains grown on solid germination medium. **B**, Length/width ratio of pollen grains grown for 6 and 24 h on solid germination medium. Measures have been made using Image J software and are the means of at least 200 measurements per sample. *, extremely statistically different from the WT (the two-tailed P value is less than 0.0001).
C, Abnormal germinated pollen grains of *ppme1* and *pme48* (upper panel) and abnormal pollen tubes of *pme48* cultured for 6 h in liquid germination medium (lower panel, red arrows).

CONCLUSIONS

The two pollen specific PMEs, AtPME 48 and AtPPME1, play a key role during the germination of the pollen grains.

They may participate in the modulation of the hydrophobic state of the grain that promotes a rapid rehydration and a subsequent successful germination.

1: Micheli et al., 2001; 2.Hruz et al., 2008; 3.Winter et al., 2007)

Journées du Réseau Français des Parois (RFP), Lille, France. 6-8 Juin 2011

Involvement of pectin methylesterases in *Arabidopsis* pollen imbibition and germination.

Leroux C[a], Lehner A[a], Kiefer-Meyer MC[a], Pelloux J[b], Driouich A[a], Lerouge P[a] & Mollet JC[a]

[a] *Laboratoire Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale, UPRES-EA 4358, PRIMACEN IBiSA, IRIB, Université de Rouen, 76821 Mont Saint-Aignan Cedex, France.*
[b] *Biologie des Plantes et contrôle des Insectes ravageurs, UPRES-EA 3900, Université de Picardie-Jules Verne, 80039 Amiens, France.*

❶ During sexual plant reproduction, pollen germination and pollen tube elongation in the pistil are essential for delivering sperm cells to the ovule (Fig. 1).
Pollen grain contains two sperm cells and a vegetative cell limited from the outside to the inside, by the exine, the intine and the plasma membrane. The water influx permit the imbibition (Fig. 2a), before a calcium influx (Fig. 2b) which is localized at the future site of emergence of the tube (Fig. 2c).

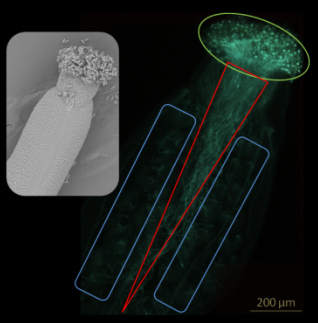


Figure 1: in-vivo pollen tube growth in the pistil stained by Aniline blue. Green zone: Pollen grains on stigma. Red zone: Pollen tubes in the transmitting tract. Blue zone: Ovary.

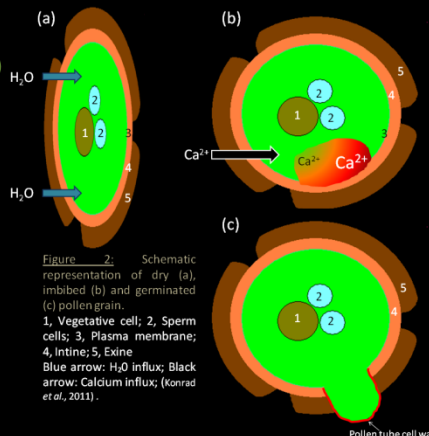


Figure 2: Schematic representation of dry (a), imbibed (b) and germinated (c) pollen grain.
1, Vegetative cell; 2, Sperm cells; 3, Plasma membrane; 4, Intine; 5, Exine
Blue arrow: H_20 influx; Black arrow: Calcium influx; (Konrad *et al.*, 2011).

❷ The intine is composed of complex polysaccharides including homogalacturonans (HGs) which are secreted in the cell wall in a highly methyesterified form.
Demethylesterification of HGs is catalyzed in the cell wall by pectin methylesterases (PMEs). Interestingly, more than 20% of Arabidopsis PMEs (14 among 66) are specifically expressed in pollen grain and pollen tube. Their expression is gene- and time- dependent (Fig. 3).

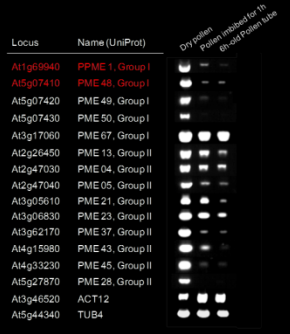


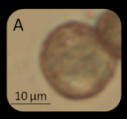
Figure 3: RT-PCR detection of PMEs transcripts in wild type pollen grains, imbibed pollen grains and pollen tubes. Gene identities of RT-PCR products are indicated on the left. An equal amount of cDNA was amplified in each sample. ACT12 and TUB4 have been used as positive controls.

❸Two knock-out mutants impaired in two homologous PME (*ppme1* and *pme48;* Fig. 3) present a strong delay in pollen germination (not shown) and a remarkable phenotype with multiple pollen tube tips emerging from the grain (Fig. 4D).

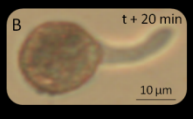
❹ The possible implication of PMEs, HGs, calcium ions and polygalacturonases during pollen germination is presented Figure 4. It is based on the phenotypes of WT (A, B) or mutant (C, D) pollen grains observed during imbibition and pollen tube growth.

i) Random action of PME : The partially de-methylesterified HGs may become a target for pectin-degrading enzymes, such as polygalacturonases.
-> Enzymatic degradation of the intine and mechanical rupture of the exine due to turgor pressure.

ii) Block-wize action of the PME : The blocks of de-methylesterified HGs can interact with Ca^{2+} promoting the formation of the "egg-box" structure and thus rigidifying the intine.
-> Mechanical rupture of the intine and exine due to turgor pressure.



WT: methylesterified HGs are hydrophobic. Upon the action of PME they become more hydrophilic.
->the imbibition is fast in WT (A).
-> PMEs are present, structure or mechanical properties of the intine are modified, the tube can emerge from the grain(B).



Mutants: methylesterified HGs are hydrophobic. De-methylesterification is perturbed.
->the imbibition is slow (C).
-> PME actions are reduced. Germination is perturbed : No germination (D, left grain) or abnormal germination with a first tube that fails to emerge and a second tube that takes over to ensure future fertilization (D, right grain)

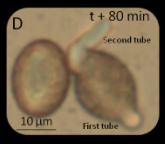
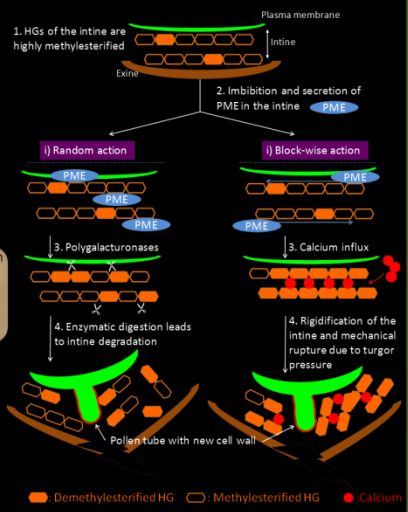


Fig 4: Theoretical model presenting the possible involvement of PME during pollen grain germination



Enzymatic activity of PME appears to be essential during pollen germination by facilitating the rupture of the pollen grain wall and then the emergence of the pollen tube

Konrad *et al.* (2011). Calcium regulation of tip growth: new genes for old mechanisms *Current opinion in plant biology* 14:1-10.

15ème journée de l'Ecole doctorale Normande Biologie Intégrative, Santé, Environnement (EdNBISE), Rouen, France. 23 Mars 2012.

AtPPME1 and AtPME48, two homologous pectin methylesterases involved in Arabidopsis pollen grain germination

Leroux C[1], Lehner A[1], Kiefer-Meyer MC[1], Pelloux J [2], Driouich A[1], Lerouge P[1] & Mollet JC[1]

[1] Laboratoire Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale, UPRES-EA 4358, PRIMACEN IBiSA, IRIB, Université de Rouen, 76821 Mont Saint-Aignan Cedex, France.

[2] Biologie des Plantes et contrôle des Insectes ravageurs, UPRES-EA 3900, Université de Picardie-Jules Verne, 80039 Amiens, France.

❶ During sexual plant reproduction, pollen germination and pollen tube elongation in the pistil are essential for delivering sperm cells to the ovule (Fig. 1).
Pollen grain contains two sperm cells and a vegetative cell limited from the outside to the inside, by the exine, the intine and the plasma membrane. The water influx permit the imbibition (Fig. 2a), before a calcium influx (Fig. 2b) which is localized at the future site of emergence of the tube (Fig. 2c).

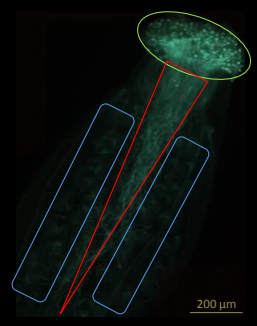


Figure 1: *In-vivo* pollen tube growth in the pistil stained by aniline blue. Green zone: Pollen grains on stigma. Red zone: Pollen tubes in the transmitting tract. Blue zone: Ovary.

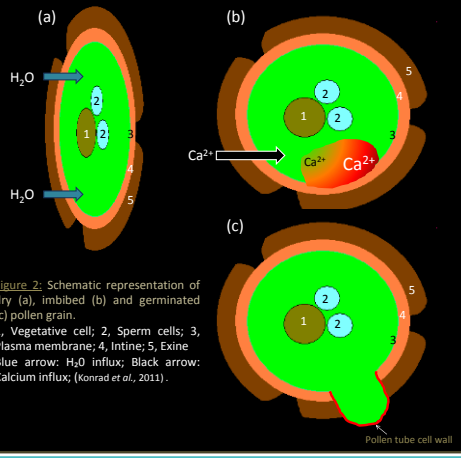


Figure 2: Schematic representation of dry (a), imbibed (b) and germinated (c) pollen grain.
1, Vegetative cell; 2, Sperm cells; 3, Plasma membrane; 4, Intine; 5, Exine
Blue arrow: H_20 influx; Black arrow: Calcium influx; (Konrad *et al.*, 2011).

❷ The intine is composed of complex polysaccharides including homogalacturonans (HGs) which are secreted in the cell wall in a highly methyesterified form.
Demethylesterification of HGs is catalyzed in the cell wall by pectin methylesterases (PMEs). Interestingly, more than 20% of Arabidopsis PMEs (14 among 66) are specifically expressed in pollen grain and pollen tube. Their expression is gene- and time- dependent (Fig. 3).

Locus	Name (UniProt)
At1g69940	PPME 1, Group I
At5g07410	PME 48, Group I
At5g07420	PME 49, Group I
At5g07430	PME 50, Group I
At3g17060	PME 67, Group I
At2g26450	PME 13, Group II
At2g47030	PME 04, Group II
At2g47040	PME 05, Group II
At3g05610	PME 21, Group II
At3g06830	PME 23, Group II
At3g62170	PME 37, Group II
At4g15980	PME 43, Group II
At4g33230	PME 45, Group II
At5g27870	PME 28, Group II
At3g46520	ACT12
At5g44340	TUB4

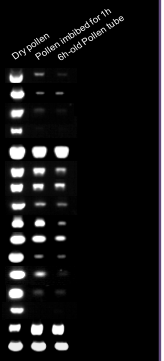
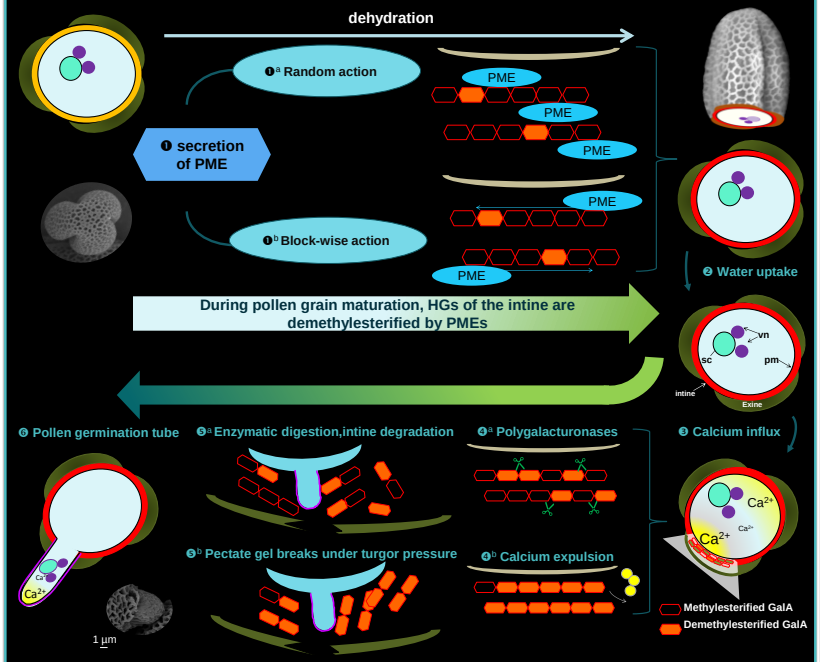


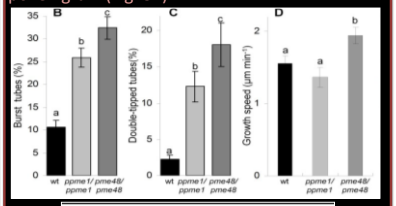
Figure 3: RT-PCR detection of PMEs transcripts in wild type pollen grains, imbibed pollen grains and pollen tubes. Gene identities of RT-PCR products are indicated on the left. An equal amount of cDNA was amplified in each sample. ACT12 and TUB4 have been used as positive controls.

Fig 5. Possible model of PME action during pollen formation, imbibition and germination :



❶, PME may be secreted in the intine wall during the dehydration phase of the pollen grain and start to act on the methylesterified form of HG by random (❶ᵃ) or upon block wise actions (❶ᵇ). Methylesterified HG of the intine (yellow) is then transformed in weakly methylesterified HG (red). The dry pollen grain contains mostly weakly esterified HG that may form pectate gel with calcium. ❷, imbibition of pollen grain is enhanced by the more hydrophilic weakly methylesterified HG. ❸, the source of calcium creating the calcium influx in the pollen grain may originate from the expulsion of Ca^{2+} from the pectate gel (❹ᵇ) thus weakening the mechanical properties of the intine that may break under turgor pressure (❺ᵇ). Alternatively, the randomly demethylesterified HG of intine may be degraded by polygalacturonases (❹ᵃ) leading to the degradation of the intine wall (❺ᵃ). ❻, These processes may promote the emergence of the pollen tube tip and allow the germination of the pollen grain. sc, sperm cells; vn, vegetative nucleus; pm, plasma membrane; GalA, galacturonic acid.

❸Two knock-out mutants impaired in two homologous PME (*ppme1* and *pme48*) present a remarkable phenotypes (Fig. 3B; C; D) with multiple pollen tube tips emerging from the pollen grain (Fig. 3E).



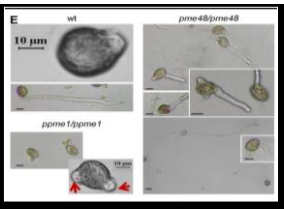


Figure 4: (B) Estimation of the rate of burst pollen tubes. (C) Estimation of the rate of pollen grains with two emerging tips. (D) Estimation of the growth speed of germinated pollen tubes. Wild-type, black bars; ppme1/ppme1, light grey bars; pme48/pme48, dark grey bars. (E) Close up of abnormal phenotypes observed in the mutant lines compared to the wild-type. All the pictures were taken 6h after imbibition excepted for the wild type: upper picture 30 min after imbibition, lower picture 2h after imbibition. Arrow shows the pollen tube tips; scale bar represent 10µm (E). Different letters indicate Student's t-test (P<0.0001) significant differences among the wild-type, ppme1/ppme1 and pme48/pme48 lines. N›100 in B and C, n=20 in D.

Enzymatic activity of PME appears to be essential during pollen germination by facilitating the rupture of the pollen grain wall and then the emergence of the pollen tube.

Konrad *et al*; (2011). Calcium regulation of tip growth: new genes for old mechanisms *Current opinion in plant biology* 14:1-10.

21ème édition de la Fête de la Science, Rouen, France (grand public). 10-14 Octobre 2012.

A new model depicting the role of PME during dehydration and germination of pollen grain.

Leroux C[1], Lehner A[1], Kiefer-Meyer MC[1], Pelloux J [2], Driouich A[1], Lerouge P[1] & Mollet JC[1]

[1] Laboratoire Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale, UPRES-EA 4358, IRIB, Université de Rouen, 76821 Mont Saint-Aignan Cedex, France.
[2] Biologie des Plantes Innovation, UPRES-EA 3900, Université de Picardie-Jules Verne, 80039 Amiens, France.

I. During sexual plant reproduction, pollen germination and pollen tube elongation in the pistil are essential for delivering sperm cells to the ovule (Fig. 1, a-e).

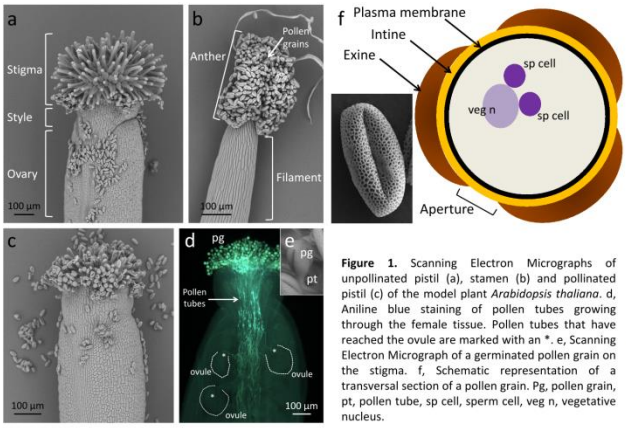


Figure 1. Scanning Electron Micrographs of unpollinated pistil (a), stamen (b) and pollinated pistil (c) of the model plant *Arabidopsis thaliana*. d, Aniline blue staining of pollen tubes growing through the female tissue. Pollen tubes that have reached the ovule are marked with an *. e, Scanning Electron Micrograph of a germinated pollen grain on the stigma. f, Schematic representation of a transversal section of a pollen grain. Pg, pollen grain, pt, pollen tube, sp cell, sperm cell, veg n, vegetative nucleus.

Pollen grain contains two sperm cells and a vegetative cell limited by the exine, the intine and the plasma membrane (Fig.1, f). The intine is composed of complex polysaccharides including homogalacturonans (HGs) which are secreted in the cell wall in a highly methylesterified form. Demethylesterification of HGs is catalyzed in the cell wall by pectin methylesterases (PMEs).

II. Two *PME*, *PPME1* and *PME48* are strongly expressed in dry pollen grain (PG) and slightly expressed in imbibed PG and pollen tube (Fig.2)

Locus	Name (UniProt)
At1g69940	PPME 1, Group I
At5g07410	PME 48, Group I
At3g46520	ACT12
At5g44340	TUB4

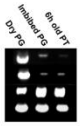


Figure 2. RT-PCR amplification of *PPME1* and *PME48* transcripts in wild type pollen grains, imbibed pollen grains and pollen tubes. *ACT12* and *TUB4* have been used as positive controls.

III. Mutants for *PME48* and *PPME1* germinated very slowly, 13h to reach 50% of germination (T_{50}) compared to 2h for the wild type. Mutants presented phenotypes with two tubes emerging from the grain.

IV. Immunodetection of highly methylesterified HG showed that intine was more methylesterified in the mutants than in the wild type.

line	T_{50} (h)	phenotype	Immunodetection of highly methylesterified HGs
Wild type	2		
pme48 -/- KO for PME48	13		
ppme1-/- KO for PPME1	13		

What are the roles of PMEs during pollen dehydration, imbibition and germination?

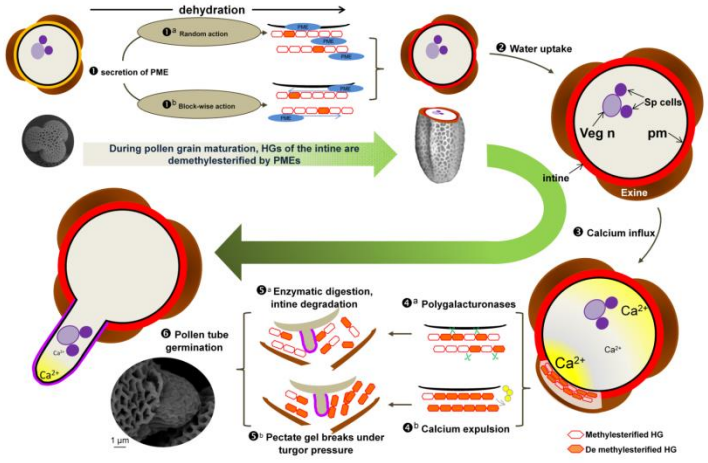
, PME may be secreted in the intine during the dehydration and start demethylesterifying HG, randomly ([a]) or upon block wise actions ([b]). In dry grain, intine is weakly methylesterified.

, imbibition of pollen grain is enhanced by the hydrophilic weakly methylesterified HG.

, Calcium influx in the pollen grain may originate from the expulsion of Ca^{2+} from the pectate gel ([b]) thus weakening the mechanical properties of the intine that may break under turgor pressure ([b]).

Alternatively, the randomly demethylesterified HG of intine may be degraded by polygalacturonases ([a]) leading to the degradation of the intine wall ([a]).

, Pollen tube germination.



HG, homogalacturonans, pm, plasma membrane, Sp cells, sperm cells, Veg n, vegetative nucleus

Colloque Grands Réseaux de Recherche, Rouen, France. 29-30 Novembre 2012.

A new model depicting the role of PME during dehydration and germination of pollen grain.

Leroux C[1], Lehner A[1], Kiefer-Meyer MC[1], Pelloux J [2], Driouich A[1], Lerouge P[1] & Mollet JC[1]

[1] Laboratoire Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale, UPRES-EA 4358, IRIB, Université de Rouen, 76821 Mont Saint-Aignan Cedex, France.
[2] Biologie des Plantes Innovation, UPRES-EA 3900, Université de Picardie-Jules Verne, 80039 Amiens, France.

I. During sexual plant reproduction, pollen germination and pollen tube elongation in the pistil are essential for delivering sperm cells to the ovule (Fig. 1, a-e).

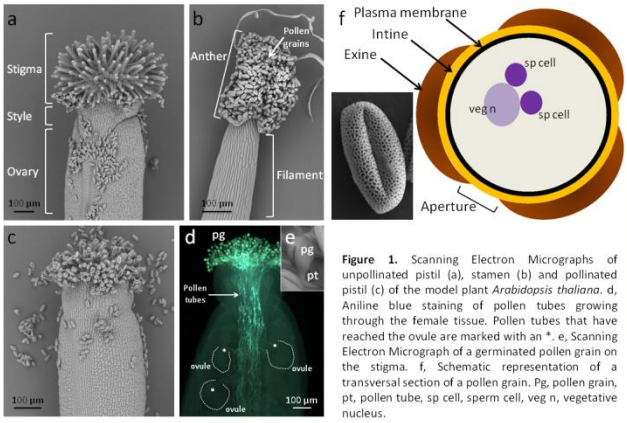


Figure 1. Scanning Electron Micrographs of unpollinated pistil (a), stamen (b) and pollinated pistil (c) of the model plant *Arabidopsis thaliana*. d, Aniline blue staining of pollen tubes growing through the female tissue. Pollen tubes that have reached the ovule are marked with an *. e, Scanning Electron Micrograph of a germinated pollen grain on the stigma. f, Schematic representation of a transversal section of a pollen grain. Pg, pollen grain, pt, pollen tube, sp cell, sperm cell, veg n, vegetative nucleus.

Pollen grain contains two sperm cells and a vegetative cell limited by the exine, the intine and the plasma membrane (Fig.1, f). The intine is composed of complex polysaccharides including homogalacturonans (HGs) which are secreted in the cell wall in a highly methylesterified form. Demethylesterification of HGs is catalyzed in the cell wall by pectin methylesterases (PMEs).

II. Two *PME*, *PPME1* and *PME48* are strongly expressed in dry pollen grain (PG) and slightly expressed in imbibed PG and pollen tube (Fig.2)

Locus	Name (UniProt)
At1g69940	PPME 1, Group I
At5g07410	PME 48, Group I
At3g46520	ACT12
At5g44340	TUB4

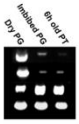
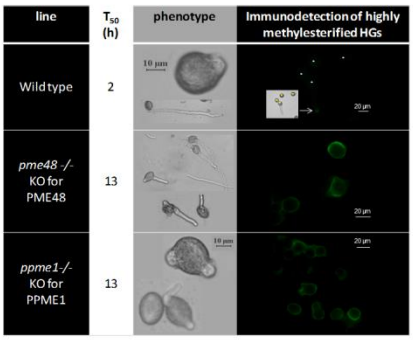


Figure 2. RT-PCR amplification of *PPME1* and *PME48* transcripts in wild type pollen grains, imbibed pollen grains and pollen tubes. *ACT12* and *TUB4* have been used as positive controls.

III. Mutants for *PME48* and *PPME1* germinated very slowly, 13h to reach 50% of germination (T_{50}) compared to 2h for the wild type. Mutants presented phenotypes with two tubes emerging from the grain.

IV. Immunodetection of highly methylesterified HG showed that intine was more methylesterified in the mutants than in the wild type.



What are the roles of PMEs during pollen dehydration, imbibition and germination?

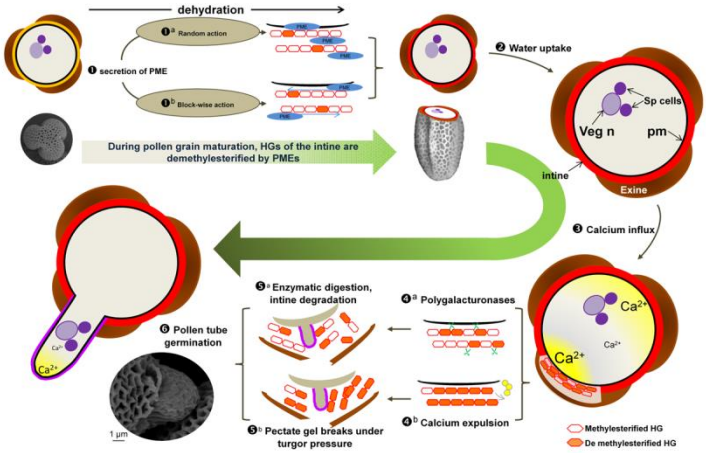
❶, PME may be secreted in the intine during the dehydration and start demethylesterifying HG, randomly (❶[a]) or upon block wise actions (❶[b]). In dry grain, intine is weakly methylesterified.

❷, imbibition of pollen grain is enhanced by the hydrophilic weakly methylesterified HG.

❸, Calcium influx in the pollen grain may originate from the expulsion of Ca^{2+} from the pectate gel (❹[b]) thus weakening the mechanical properties of the intine that may break under turgor pressure (❺[b]).

Alternatively, the randomly demethylesterified HG of intine may be degraded by polygalacturonases (❹[a]) leading to the degradation of the intine wall (❺[a]).

❻, Pollen tube germination.



HG, homogalacturonans, pm, plasma membrane, Sp cells, sperm cells, Veg n, vegetative nucleus

2ème journée scientifique de l'IRIB, Rouen, France. 21 Juin 2013.

AtPME48 encodes a pectin methylesterase involved in Arabidopsis pollen grain germination

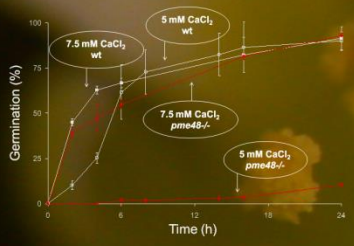
Lehner A[(a)], Leroux C[(a)], Guénin S[(b)], Fournet F[(b)], Kiefer-Meyer M-C[(a)], Pelloux J[(b)], Driouich A[(a)], Lerouge P[(a)], Mollet J-C[(a)]

[(a)] Laboratoire Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale, UPRES-EA 4358, PRIMACEN IBiSA, IRIB, Université de Rouen, 76821 Mont Saint-Aignan Cedex, France; [(b)] Biologie des Plantes et Innovation, UPRES-EA 3900, Université de Picardie-Jules Verne, 80039 Amiens, France.

ABSTRACT

PME48 encodes for a pollen-specific PME. Homozygous mutant lines (*pme48-/-*) were isolated and the pollen grains were analysed. Germination was strongly delayed in *pme48 -/-* and might be related to a slower imbibition. Interestingly, when calcium was added to the germination medium, the imbibition and the germination were fully restored in *pme48-/-*. Moreover, we showed that the intine wall of the mutant contained more highly methylesterified homogalacturonan (HG) than in the wild type. A model summarizing the role of PME48 and calcium during germination of the pollen grain is presented .

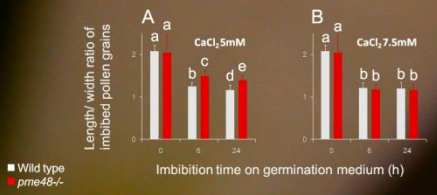
1. pollen grain germination



In standard germination medium (5 mM $CaCl_2$), pollen grain germination is strongly delayed in *pme48-/-* compared to the wild type. The percentages of germination reached 10 and 90 % after 24h for *pme48-/-* and for the wild type, respectively .

When calcium concentration is increased in the germination medium (7.5 mM), pollen grains from *pme48-/-* germinated as fast as the wild type and reached 90% after 24h.

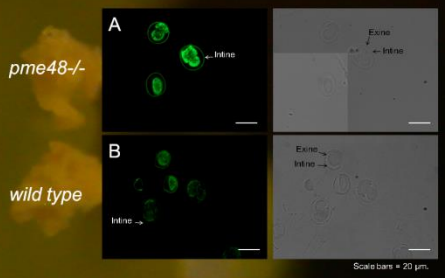
2. Measurement of the imbibition rates



As pollen grains became spherical during rehydration, the rate of imbibition was estimated by measuring the ratio length/width of the pollen grains. The imbibition of *pme48-/-* was never fully achieved in 5 mM $CaCl_2$ (A). Interestingly the imbibition was fully restored for *pme48-/-* in the presence of 7.5 mM $CaCl_2$ (B).

Letters indicate statistically significant differences among the wild-type and *pme48-/-* lines, as determined by Student's t-test (P<0.0001)

3. Immuno-localization of highly methylesterified HG



Immuno-localisation of the highly methylesterified epitopes of HG was performed on dry pollen grains from *pme48-/-* and wild type plants using the monoclonal antibody JIM7. the intine wall was strongly labelled in *pme48-/-* (A) compared to the wild type (B) suggesting that the intine wall of the mutant is more methylesterified.

As methyl groups are hydrophobic, the higher level of methylesterified HG in the mutant compared to the wild type may explain the difficulty of the pollen grains to rehydrate properly in *pme48-/-*.

4. What may be the role of PME48 in pollen grains?

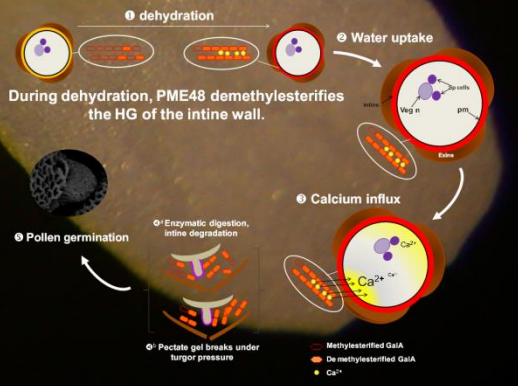
❶, PME48 may be secreted in the intine wall during the dehydration and starts to demethylesterify the HG. In wild type dehydrated pollen grains, intine is weakly methylesterified compared to the mutant *pme48-/-*.

❷, imbibition of pollen grain is enhanced by the hydrophilic weakly methylesterified HG.

❸, Calcium influx in the pollen grain may originate from the expulsion of Ca^{2+} from the pectate gel thus weakening the mechanical properties of the intine that may break under turgor pressure (❹ᵇ).

Alternatively, demethylesterified HG of the intine may be degraded by polygalacturonases (❹ᵃ) leading to the degradation of the intine wall.

❺, Pollen tube germination.



GalA, galacturonic acid; pm, plasma membrane; Sp cells, sperm cells; Veg n, vegetative nucleus.

XIII[th] Cell Wall Meeting, Nantes, France. 7-12 Juillet 2013.

23rd ICSPR, Porto 2014, July – 13th to 18th.

Decrease in PME48 activity leads to abnormal pollen germination

Leroux C[a], Bouton S[b], Morvan C[c], Fournet F[b], Guénin S[b], Kiefer-Meyer MC[a], Mareck A[a], Pelloux J[b], Driouich A[a], Lerouge P[a], Lehner A[a] & Mollet JC[a].

[a] Laboratoire 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.
[b] Laboratoire Biologie des Plantes & Innovation (BIOPI) EA3900, University of Picardie Jules Verne, 80039 Amiens, France.
[c] Laboratoire Polymères, Biopolymères, Surfaces (PBS) UMR6270, FR3038 CNRS, Normandy University, University of Rouen, Institut de Recherche et d'Innovation Biomédicale, 76821 Mont-Saint-Aignan, France.

INTRODUCTION

Germination of the pollen grain on the stigma is the first step of the reproduction process. It needs a complete and rapid rehydration of the pollen that may be controlled by the variation of the degree of methylesterification of pectic homogalacturonans (HGs). Methylester groups are hydrophobic and they can be removed from the HGs by the action of pectin methylesterases (PME)[1]. The expression of a gene coding for a pollen specific PME : At*PME48* has been analyzed by RT-qPCR and a *PRO::PME48-sYFP* line. Moreover, we have investigated the role of reduced PME activity on the pollen grain germination using a knock-down mutant for *PME48*.

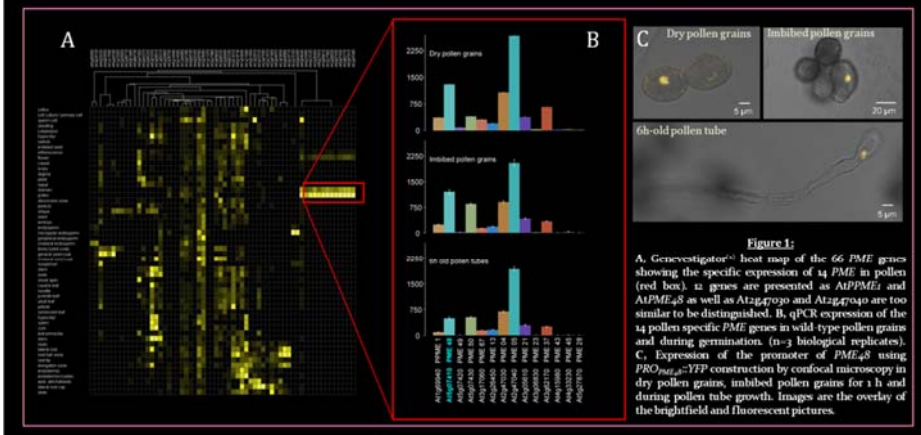


Figure 1:
A, Genevestigator[c] heat map of the 66 *PME* genes showing the specific expression of 14 *PME* in pollen (red box). 12 genes are presented as At*PMEs* and At*PME48* as well as At2g47030 and At2g47040 are too similar to be distinguished. B, qPCR expression of the 14 pollen specific *PME* genes in wild-type pollen grains and during germination. (n=3 biological replicates). C, Expression of the promoter of *PME48* using PRO_{PME48}::*YFP* construction by confocal microscopy in dry pollen grains, imbibed pollen grains for 1 h and during pollen tube growth. Images are the overlay of the brightfield and fluorescent pictures.

1. At*PME48* expression profile

- 14 *PMEs* are pollen specific (Fig. 1A)
- *AtPME48* is strongly expressed in wild-type dry pollen grains, imbibed pollen grains and 6h-old pollen tubes grown *in vitro* (Fig. 1B).
- The promoter of *PME48 (PRO::PME48)* is strongly expressed in dry pollen grains, imbibed pollen grains and in 6h-old pollen tube (Fig. 1C).

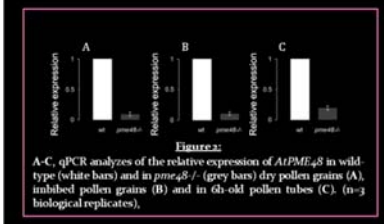


Figure 2:
A-C, qPCR analyzes of the relative expression of *AtPME48* in wild-type (white bars) and in *pme48-/-* (grey bars) dry pollen grains (A), imbibed pollen grains (B) and in 6h-old pollen tubes (C). (n=3 biological replicates).

2. Effect of the loss of the PME48

- In *pme48-/-*, the expression of *AtPME48* is reduced by 90% in dry and imbibed pollen grains (Fig. 2A, B) and by 80% in pollen tubes (Fig. 2C).
- PME activity corresponding to PME48 is lost in the mutant (Fig. 3A, blue circle). Note that PME28 does not appear on the zymogram as its pI is too acidic.
  The total PME activity is reduced of 50% in the mutant (Fig. 3B).
- FT-IR analyzes on pectin extracts from dry pollen grains show a significant 2-fold higher level of the degree of methylesterification of the HG in *pme48-/-* (Fig. 3C-D).
- The higher level of degree of methylesterification of the HG in *pme48-/-* pollen grains is correlated with a strong delay in pollen germination. Only 10% of the mutant grains were germinated after 24 h (Fig. 3E).

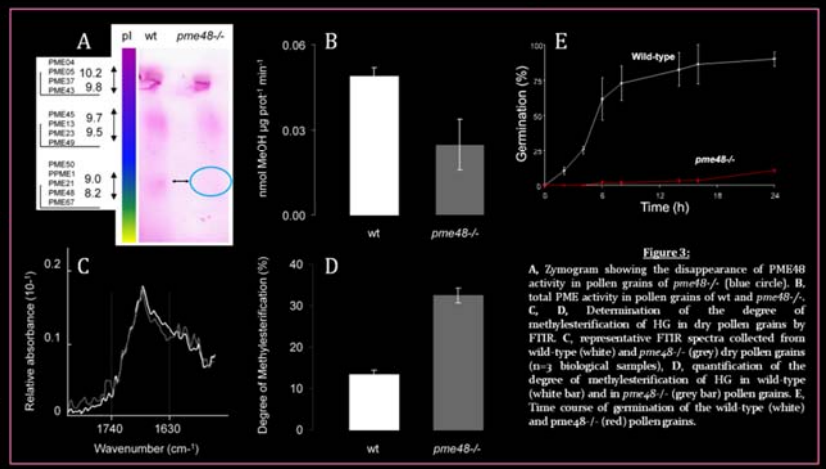


Figure 3:
A, Zymogram showing the disappearance of PME48 activity in pollen grains of *pme48-/-* (blue circle). B, total PME activity in pollen grains of wt and *pme48-/-*. C, D, Determination of the degree of methylesterification of HG in dry pollen grains by FTIR. C, representative FTIR spectra collected from wild-type (white) and *pme48-/-* (grey) dry pollen grains (n=3 biological samples). D, quantification of the degree of methylesterification of HG in wild-type (white bar) and in *pme48-/-* (grey bar) pollen grains. E, Time course of germination of the wild-type (white) and pme48-/- (red) pollen grains.

CONCLUSIONS

The loss of PME48 activity leads to a higher degree of methylesterification of the HG in the intine of the pollen grain resulting in a strong delay of pollen germination.

PME48 participates in the removal of the hydrophobic methylester groups of the HG during maturation of the pollen grain promoting its proper germination.

References: 1. Micheli *et al.*, 2001; 2. Hruz *et al.*, 2008;

23rd Congrès ICSPR2014 (International Congress on Sexual Plant Reproduction), Porto, Portugal. 13-18 Juillet 2014.

202A Route de Dieppe
76250 Déville lès Rouen
☏: +33(0)6.70.86.05.91
@: christelleleroux3@gmail.com
27 ans, Célibataire, Permis B, véhicule personnel

LEROUX Christelle

Doctorat en biologie cellulaire végétale

CURSUS UNIVERSITAIRE et DIPLÔMES

Octobre 2011- aujourd'hui : Doctorat en Biologie Cellulaire Végétale – Laboratoire Glyco-MEV EA 4358- Université de Rouen.

2009-2011 : Master recherche de biologie cellulaire parcours Ecophysiologie et BioTechnologie Végétale - Université de Rouen - Mention Bien.

2005-2009 : Licence de biologie cellulaire et physiologie - Université de Rouen**.**

Juin 2005 : Baccalauréat Scientifique spécialité SVT– Lycée Jehan Ango – Dieppe.

EXPÉRIENCE PROFESSIONNELLE

2011- aujourd'hui: Doctorat en Biologie Cellulaire Végétale - Laboratoire Glyco-MEV - Université de Rouen : « Implication des pectines méthyl-estérases (PME) et de leurs inhibiteurs (PMEI) au cours de l'imbibition et de la germination du grain de pollen ainsi qu'au cours de la croissance polarisée du tube pollinique chez *Arabidopsis thaliana.*»

Décembre 2012 : Séjour scientifique à l'Université de Porto - Portugal. Technique de culture de tube pollinique en semi *in vivo* (SIV).

Février-Juillet 2011 : Stage de Master 2 – Laboratoire Glyco-MEV - Université de Rouen. Implication de deux pectines méthylestérases dans la croissance du tube pollinique chez *Arabidopsis thaliana*.

Février-Août 2010 : Stage de Master 1 - Université de Porto - Portugal. Etude de l'inactivation du gène codant pour l'arabinogalactane protéine 40 pollen spécifique sur le développement du pollen et la croissance du tube pollinique chez *Arabidopsis thaliana*.

Eté 2009 : Stage d'observation - laboratoire de recherche Glyco-MEV – Université de Rouen. Etude d'un protocole d'extraction d'arabinogalactane protéines (AGP).

Stage d'observation au sein du laboratoire de la coopérative agricole Terre de lin - Saint-Pierre le Vigier. Etude de la sélection variétale du lin d'hiver.

COMPÉTENCES TECHNIQUES

Biologie moléculaire: Extraction ADNg et ARN ; PCR, RT-PCR, qPCR ; dosage d'acide nucléique (Nanodrop) ; construction plasmidique (Technologie Gateway, USER, LIC) ; purification d'ADN plasmidique ; transformations bactériennes thermocompétentes ; floral dip.

Culture cellulaire: Culture *in-vitro* de pollen en milieu liquide, solide et semi *in-vivo* ; culture Bactérienne (*E. coli* et *A. tumefasciens*).

Microscopie: Optique et fluorescente ; enrésinements : LR-white et méthacrylate ; microtomie ; immunomarquages indirects ; colorations.

AUTRES COMPÉTENCES

Anglais: Scientifique et communication courante (séjour scientifique de 6 mois à Porto / Formation EdNBISE)

Utilisation de Logiciel: Microsoft office ; Open office ; Leica application suite ; Image J ; GIMP2 ; qbasePLUS et DataAssist.

Analyses statistiques: Test de Student ; Anova.

202A Route de Dieppe
76250 Déville lès Rouen
☏: +33(0)6.70.86.05.91
@: christelleleroux3@gmail.com
27 ans, Célibataire, Permis B, véhicule personnel

LEROUX Christelle

Doctorat en biologie végétale

PUBLICATIONS

1. **Leroux C**, Bouton S, Kiefer-Meyer MC, Tohnyui Ndinyanka F, 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 Physiology. 2015. 167 : 347-380. *Equal contribution of the senior authors.

2. Paynel F, **Leroux C**, Surcouf O, Schaumann A, Pelloux J, Driouich A, Mollet JC, Lerouge P, Lehner A*, Mareck A*. 2014. Kiwi fruit PMEI inhibits PME activity, modulates root elongation and induces pollen tube burst in *Arabidopsis thaliana*. Plant Growth Regulation. 2014. 74 : 285-297. *Equal contribution of the senior authors.

3. Mollet JC, **Leroux C**, Dardelle F, Lehner A. 2013. Cell wall composition, Biosynthesis and Remodeling during Pollen Tube Growth. Plants. 2013. 2 : 107-147.

COMMUNICATIONS ORALES EN ANGLAIS

1. **Leroux C**, Bouton S, Kiefer-Meyer MC, Morvan C, Pelloux J, Driouich A, Lerouge P, Lehner A, Mollet JC. Involvement of pectin methylesterase during imbibition and germination of *Arabidopsis* pollen grain. Journée mini-talk, Université de Rouen, Mont Saint-Aignan, France. 21 mars 2014.

2. **Leroux C**, Bouton S, Kiefer-Meyer MC, Pelloux J, Driouich A, Lerouge P, Lehner A, Mollet JC. Involvement of pectin methylesterase during imbibition and germination of *Arabidopsis* pollen grain. Journée Ecole doctorale Normande Biologie Intégrative, Santé, Environnement (EdNBISE), Le Havre, France, 10-11 Avril 2014.

COMMUNICATIONS AFFICHÉES

1. **Leroux C**, Bouton S, Morvan C,Fournet F, Guénin S, Kiefer-Meyer MC, Mareck A, Pelloux J, Driouich A, Lerouge P, Lehner A, Mollet JC. Decrease in PME48 activity leads to abnormal pollen germination. 23rd Congrès ICSPR2014 (International Congress on Sexual Plant Reproduction), Porto, Portugal. 13-18 Juillet 2014.

2. Lehner A, **Leroux C**, Guénin S, Fournet F, Kiefer-Meyer MC, Pelloux J, Driouich A, Lerouge P, Mollet JC. *At*PME48 encodes a pectin methylesterase involved in *Arabidopsis* pollen grain germination. XIIIth Cell Wall Meeting, Nantes, France. 7-12 Juillet 2013.

3. **Leroux C**, Lehner A, Kiefer-Meyer MC, Pelloux J, Driouich A, Lerouge P, Mollet JC. A new model depicting the role of PME during dehydration and germination of pollen grain. 2ème journée scientifique de l'IRIB, Rouen, France. 21 Juin 2013.

4. **Leroux C**, Lehner A, Kiefer-Meyer MC, Pelloux J, Driouich A, Lerouge P, Mollet JC. A new model depicting the role of PME during dehydration and germination of pollen grain. Colloque Grands Réseaux de Recherche, Rouen, France. 29-30 novembre 2012.

5. Lehner A, Dardelle F, **Leroux C,** Mollet JC. De la fleur à la graine, le fabuleux destin du pollen. 21ème édition de la Fête de la Science, Rouen, France (vulgarisation grand public). 10-14 Octobre 2012.

6. **Leroux C**, Lehner A, Kiefer-Meyer MC, Pelloux J, Driouich A, Lerouge P, Mollet JC. *At*PPME1 and *At*PME48, two homologous pectin methylesterases involved in *Arabidopsis* pollen grain germination. 1ère journée scientifique de l'IRIB, Rouen, France. 1er juin 2012.

7. **Leroux C**, Lehner A, Kiefer-Meyer MC, Pelloux J, Driouich A, Lerouge P, Mollet JC. Involvement of pectin methylesterases in *Arabidopsis* pollen imbibition and germination. Journée Ecole doctorale Normande Biologie Intégrative, Santé, Environnement (EdNBISE). Mont-saint-Aignan, France. 23 mars 2012.

8. **Leroux C**, Lehner A, Fournet F, Guénin S, Kiefer-Meyer MC, Pelloux J, Driouich A, Lerouge P, Mollet JC. Involvement of two pectin methylesterases *At*PPME1 and *At*PME48 during *Arabidopsis* pollen germination. Journées du Réseau Français des Parois,

RESPONSABILITÉ

Encadrement : 2 Stagiaires L3 - Stage d'observation de 6 semaines au sein du laboratoire Glyco-MEV en 2012 et 2013.

CENTRES D'INTÉRÊTS

Rollers ; Peinture ; Chanteuse / choriste.

23rd ICSPR, Porto 2014, July – 13th to 18th.

Decrease in PME48 activity leads to abnormal pollen germination

Leroux C[a], Bouton S[b], Morvan C[c], Fournet F[b], Guénin S[b], Kiefer-Meyer MC[a], Mareck A[a], Pelloux J[b], Driouich A[a], Lerouge P[a], Lehner A[a] & Mollet JC[a].

[a] Laboratoire 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.
[b] Laboratoire Biologie des Plantes & Innovation (BIOPI) EA3900, University of Picardie Jules Verne, 80039 Amiens, France.
[c] Laboratoire Polymères, Biopolymères, Surfaces (PBS) UMR6270, FR3038 CNRS, Normandy University, University of Rouen, Institut de Recherche et d'Innovation Biomédicale, 76821 Mont-Saint-Aignan, France.

INTRODUCTION

Germination of the pollen grain on the stigma is the first step of the reproduction process. It needs a complete and rapid rehydration of the pollen that may be controlled by the variation of the degree of methylesterification of pectic homogalacturonans (HGs). Methylester groups are hydrophobic and they can be removed from the HGs by the action of pectin methylesterases (PME)[1]. The expression of a gene coding for a pollen specific PME : At*PME48* has been analyzed by RT-qPCR and a *PRO::PME48-sYFP* line. Moreover, we have investigated the role of reduced PME activity on the pollen grain germination using a knock-down mutant for *PME48*.

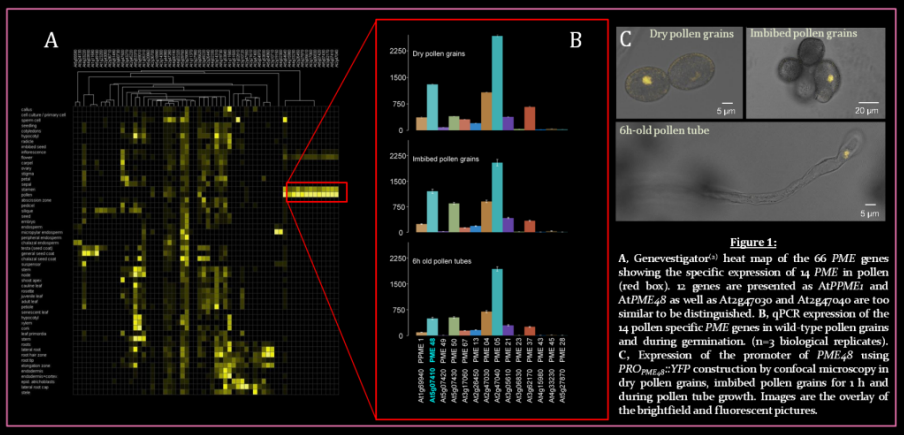


Figure 1:
A, Genevestigator[(a)] heat map of the 66 *PME* genes showing the specific expression of 14 *PME* in pollen (red box). 12 genes are presented as At*PME1* and At*PME48* as well as At2g47030 and At2g47040 are too similar to be distinguished. B, qPCR expression of the 14 pollen specific *PME* genes in wild-type pollen grains and during germination. (n=3 biological replicates). C, Expression of the promoter of *PME48* using PRO_{PME48}::*YFP* construction by confocal microscopy in dry pollen grains, imbibed pollen grains for 1 h and during pollen tube growth. Images are the overlay of the brightfield and fluorescent pictures.

1. At*PME48* expression profile

- 14 *PMEs* are pollen specific (Fig. 1A)
- *AtPME48* is strongly expressed in wild-type dry pollen grains, imbibed pollen grains and 6h-old pollen tubes grown *in vitro* (Fig. 1B).
- The promoter of *PME48 (PRO::PME48)* is strongly expressed in dry pollen grains, imbibed pollen grains and in 6h-old pollen tube (Fig. 1C).

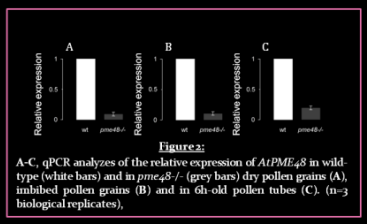


Figure 2:
A-C, qPCR analyzes of the relative expression of *AtPME48* in wild-type (white bars) and in *pme48-/-* (grey bars) dry pollen grains (A), imbibed pollen grains (B) and in 6h-old pollen tubes (C). (n=3 biological replicates),

2. Effect of the loss of the PME48

- In *pme48-/-*, the expression of *AtPME48* is reduced by 90% in dry and imbibed pollen grains (Fig. 2A, B) and by 80% in pollen tubes (Fig. 2C).
- PME activity corresponding to PME48 is lost in the mutant (Fig. 3A, blue circle). Note that PME28 does not appear on the zymogram as its pI is too acidic.

The total PME activity is reduced of 50% in the mutant (Fig. 3B).

- FT-IR analyzes on pectin extracts from dry pollen grains show a significant 2-fold higher level of the degree of methylesterification of the HG in *pme48-/-* (Fig. 3C-D).
- The higher level of degree of methylesterification of the HG in *pme48-/-* pollen grains is correlated with a strong delay in pollen germination. Only 10% of the mutant grains were germinated after 24 h (Fig. 3E).

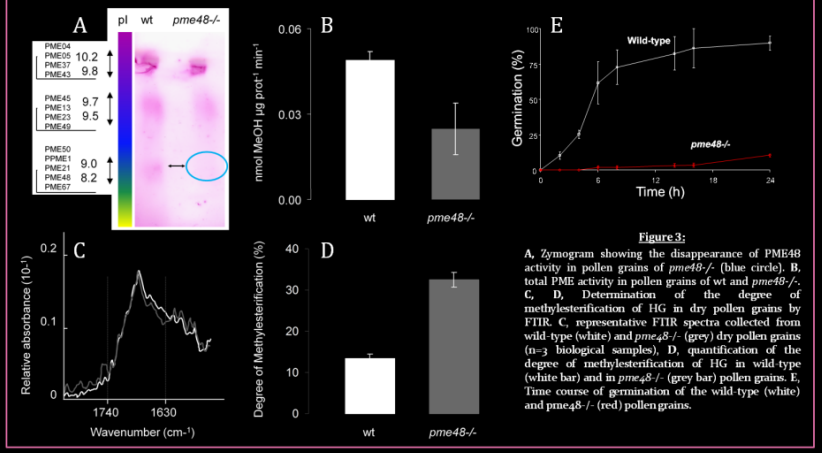


Figure 3:
A, Zymogram showing the disappearance of PME48 activity in pollen grains of *pme48-/-* (blue circle). B, total PME activity in pollen grains of wt and *pme48-/-*. C, D, Determination of the degree of methylesterification of HG in dry pollen grains by FTIR. C, representative FTIR spectra collected from wild-type (white) and *pme48-/-* (grey) dry pollen grains (n=3 biological samples), D, quantification of the degree of methylesterification of HG in wild-type (white bar) and in *pme48-/-* (grey bar) pollen grains. E, Time course of germination of the wild-type (white) and pme48-/- (red) pollen grains.

CONCLUSIONS

The loss of PME48 activity leads to a higher degree of methylesterification of the HG in the intine of the pollen grain resulting in a strong delay of pollen germination.

PME48 participates in the removal of the hydrophobic methylester groups of the HG during maturation of the pollen grain promoting its proper germination.

References: 1. Micheli *et al.*, 2001; 2. Hruz *et al.*, 2008;

http://glycomev.univ-rouen.fr/

23rd Congrès ICSPR2014 (International Congress on Sexual Plant Reproduction), Porto, Portugal. 13-18 Juillet 2014.