



HAL
open science

Glycomolécules de la matrice extracellulaire végétale Biosynthèse et réponses immunitaires

Marie-Laure Follet-Gueye

► **To cite this version:**

Marie-Laure Follet-Gueye. Glycomolécules de la matrice extracellulaire végétale Biosynthèse et réponses immunitaires. Biologie végétale. Université de Rouen Normandie, 2014. tel-02087498

HAL Id: tel-02087498

<https://normandie-univ.hal.science/tel-02087498>

Submitted on 2 Apr 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.



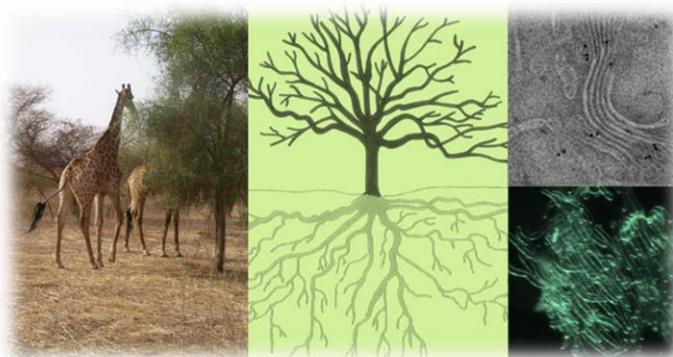
Mémoire présenté à l'Université de Rouen en vue de l'obtention de
l'Habilitation à Diriger des Recherches

par

Marie-Laure FOLLET-GUEYE

Glycomolécules de la matrice extracellulaire végétale

Biosynthèse et réponses immunitaires



10 Janvier 2014

Jury

Dr Deborah Goffner
Pr Nathalie Guivarc'h
Pr Marie-Pascale Prud'Homme
Dr Florent Yvergnaux
Pr Laurent Yon
Pr Azeddine Driouich

Directeur de Recherche CNRS, UMI ESS 3189
Université de Tours
Université de Caen
Entreprise Bio-Europe, Solabia
Université de Rouen
Université de Rouen

Rapporteur
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur

Appuis et Soutiens financiers

L'ensemble de ces travaux a été soutenu par la **région de Haute-Normandie** via le **GRR VASI**, le **FEDER**, le **Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche**, le **Fonds Unique Interministériel**, **l'Interreg IV**, la **Cosmetic Valley**. Je suis reconnaissante de leur appui et de leur soutien financier.



A
DDG
et
AFG

Proverbe africain :

« *Dans la forêt quand les branches des arbres se querellent,
leurs racines s’embrassent* »

Remerciements

J'adresse mes sincères remerciements aux rapporteurs et examinateurs qui ont accepté d'évaluer les travaux présentés dans le cadre de mon Habilitation à Diriger les Recherches : **Deborah Goffner, Nathalie Guivarc'h, Marie-Pascale Prud'Homme, Florent Yvergnaux, Laurent Yon.**

Je remercie très chaleureusement les Pr **Patrice Lerouge** et **Azeddine Driouich**, directeur et directeur adjoint du Laboratoire GlycoMEV pour leurs précieux et solides appuis tout au long de mes activités de recherche.

Je suis tout particulièrement reconnaissante à **Azeddine Driouich**, qui m'a accueillie au sein de son équipe en 2000, et qui dès lors m'a toujours accordé sa confiance et son soutien. Outre la recherche de financements, la conception et la gestion de projets, j'ai surtout appris au cours de ces années, que la passion investie élargie le champ des possibles. Merci, pour les nombreuses opportunités que tu m'as offertes et qui m'ont permis de prendre confiance en moi, de progresser pas à pas, et de pouvoir aujourd'hui soutenir une Habilitation à Diriger les Recherches.

Je tiens également à remercier **Maïté Vicro-Gibouin** qui m'a beaucoup aidé par son soutien, ses nombreux conseils et son amitié. Merci de m'avoir impliquée dans les travaux sur les BLCs et pour la façon harmonieuse dont nous travaillons et nous épaulons au quotidien.

Je souhaite bien-sûr remercier mes amies microscopistes. Et tout d'abord, **Laurence Chevalier** qui a assuré les développements méthodologiques de l'HPF EMPact1 avec toute la rigueur et le professionnalisme qui la caractérisent. J'ai beaucoup apprécié de travailler à tes côtés et te remercie sincèrement pour ton soutien et ton infaillible amitié. J'adresse également mes plus vifs remerciements à **Sophie Bernard**, qui gère avec une grande efficacité le service de microscopie à nos côtés. Je suis très heureuse de te savoir bientôt docteur, chère Sophie et te félicite ! Merci **Yasmina** pour ton travail avec **Giuseppe** sur le projet SkinOFlor, ta bonne humeur et ta gentillesse. Je n'oublie pas la petite dernière, **Jessica** dont l'arrivée est un réel atout pour notre service. Merci pour ton soutien et ton aide précieuse ces derniers temps.

Je remercie toutes les personnes ayant participé et participant aux différents projets et tout particulièrement **Magalie Bénard** pour sa disponibilité et ses précieux conseils, **Eric Nguema-Ona** pour toutes les compétences apportées concernant les AGPs, et **Jean-Claude Mollet** avec qui j'ai le plaisir d'encadrer la thèse de **Rim**. Je suis très heureuse de pouvoir saluer les amis du projet SkinOFlor qui ont fait de cette aventure une expérience enrichissante scientifiquement et humainement. Merci **Giuseppe** pour avoir si bien initié ce nouveau volet de nos travaux qui ouvre des perspectives de recherches passionnantes. Je tiens également à remercier **Deborah Goffner** de m'avoir donné l'opportunité de rencontrer nos collègues de physiologie végétale à Dakar et de m'associer à son travail au sein de la GMV. Nous débutons aujourd'hui par le biais d'une co-tutelle de thèse ce merveilleux projet dont les objectifs écologiques et humanistes me sont chers.

Un grand MERCI à **tous les membres du laboratoire GlycoMEV**. Je souhaite tout d'abord remercier les étudiants, doctorants et post-doctorants avec qui j'ai plaisir à travailler et à apprendre, **Rim, Abder** et **Eric**. J'adresse également mes remerciements à **Marie-Christine, Gaëlle, Carole B., Carole P., Estelle** et **Gérald** pour leur aide dans la réalisation des projets et leur sympathie ; aux membres de l'équipe pédagogique de Physiologie végétale et notamment **Philippe, Jean-Claude, Arnaud, Azeddine, Sophie, Aurélie** et **Maïté**. Merci à **Odile** pour son aide dans la relecture de ce manuscrit ; à **Agnès** puis **Maud** pour les petites discussions et les encouragements, à mes collègues et amies sportives, **Pascale, Estelle, Maïté** et peut-être **Carole** !??. Je tiens enfin à remercier toutes les personnes qui par leur attention et leur écoute m'ont aidé à surmonter certains moments difficiles. Merci infiniment **Muriel, Sophie, Maïté, Azeddine** pour les invitations goûter, déjeuner etc... .

Je remercie ma famille franco-sénégalaise pour son constant soutien. A **mes sœurs** et leurs familles, à ma sœur de lait (**mon amie de 50 ans !**) et aux deux hommes de sa vie, merci pour votre fidèle présence. Je suis infiniment reconnaissante à **mes parents** pour les valeurs qu'ils m'ont transmis et qui guideront toujours ma vie. Mes pensées vont également vers **Yaye** et **Pap Falou** dont les mots, les paroles et les gestes emprunts de respect et de bienveillance à mon égard m'ont beaucoup touchée.

Enfin, j'adresse toute mon affection à **Doudou** et **Adja Fatou**. Adja, pardon d'avoir été un peu trop absorbée par mon travail, et merci pour ta patience, ta joie de vivre, tes merveilleux poèmes, tes concerts de flûte, tes cours de danse, tes pièces de théâtre et tes soirées festives etc... . Qu'est-ce que je deviendrai sans toi ?

Ton appui est primordial pour moi. Tu as toujours cru en moi et n'a jamais cessé de me soutenir et de m'accompagner dans mes choix. Doudou je t'en remercie infiniment. « *On est ensemble* » quoiqu'il arrive, aussi je te passe le relais pour que tu suives également cette belle aventure qui te permettra d'avancer dans la direction que tu ambitionnes.

Liste des abréviations

aa : acide aminé
ADN : Acide désoxyribonucléique
AF : acide fusarique
AGPs : Arabinogalactanes Protéines
Ala : alanine
ARAD1 : *arabinan deficient 1*
ARN : Acide ribonucléique
At ou *A. thaliana* : *Arabidopsis thaliana*
ATER : Attaché Temporaire aux Activités d'Enseignement et de Recherche
AUDs : *membrane-anchored UDP-D-GlcA-decarboxylases*
Avr : facteur d'avirulence
AXSs : UDP-D-Apif/UDP-D-Xyl-synthases
BAK1 : *BR1 associated kinase*
B. aegyptiaca : *Balanites aegyptiaca*
BCA : *biocontrol agent*
BCs : *Border Cells*
BiFC : *Bimolecular Fluorescence Complementation*
Bio-EC : Centre de recherches Biologiques et d'Expérimentations Cutanées
BLCc : BLCs centrales
BLCf : BLCs filamenteuses
BLCl : BLCs latérales
BLCs : *Border Like Cells*
BY-2 : *Bright Yellow-2 cells*
C : coiffe
C : cytoplasme
Ca²⁺ : ion calcium
CBS : Chimie, Biologie, Santé
CC : *Coiled-coil*
CSLC : *Cellulose synthase-like C family*
CCME : Centre Commun de Microscopie Electronique
CERMAV : Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales
CIFRE : Conventions Industrielles de Formation par la REcherche
CRCT : Congé pour Recherche et Conversion
CL : cellules latérales
CLR : *CATERPILLER proteins*
CM-H₂DCFDA : *5,6-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate*
CNRS : Centre national de la recherche scientifique
CNU : Conseil National des Universités
Col : columelle
COPIa : *Coat Protein Ia*
COPIb : *Coat Protein Ib*
COPII : *Coat Protein II*
CPER : Contrat Plan Etat Région
CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse
CSC : *Cellulose Synthase Complex*
Ct : C_{terminal}
CW : *Cell Wall*
d : *dermis*
DAMPs : *Damage-Associated Molecular Patterns*
DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole

DEA : Diplôme d'Etudes Approfondies
 DRIIHM : Dispositif de Recherche Interdisciplinaire sur les Interactions Hommes-Milieux
 DUT : Diplôme Universitaire de Technologie
 EA : Equipe Associée
 EE : *Early Endosome*
 EGF-R : *Epidermal-growth factor receptor*
 EI : Enzyme d'Interconversion
 EPHE : Ecole Pratique des Hautes Etudes
 Estipa : Ecole d'ingénieurs pour les agricultures et les territoires
 ETI : *Effector-Triggered Immunity*
 ETS : *Effector-Triggered Susceptibility*
 exDNA : *extracellular DNA*
 FAO : formes actives de l'oxygène
 FEDER : Fonds européens de développement régional
 FLA : *fasciclin-like AGPs*
 flg22 : flagelline 22
 FRE : Formation de Recherche Evolutive
 FS : *Freeze Substitution*
 FUI : Fonds Unique Interministériel
 FUT : Fucosyltransférase
 G : Golgi
 GAEs/UGlCAEs : UDP-Glc-4-épipimérase
 GalA : *Galacturonic acid*
 GFP : *Green Fluorescent Protein*
 Glyco-MEV : Glycobiologie et Matrice extracellulaire Végétale
 GMV : Grande Muraille Verte
 GPI : glycosylphosphatidylinositol
 GRR : Grands Réseaux de Recherche
 GT : glycosyltransférase
 hBD : *human-β-defensin*
 HG : homogalacturonane
 HPF : *High Pressure Freezing*
 HR : *Hypersensitive response*
 HRGPs : Hydroxyproline-rich glycoproteins
 HO- : radical hydroxyde
 H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène
 Hyp : hydroxyproline
 HypSys : *Hydroxyproline Systemins*
 IE : Ingénieur d'étude
 IFNs : interférons
 IFRMP 23 : Institut Fédératif de Recherches Multidisciplinaires sur les Peptides
 IL : interleukine
 INRA : Institut national de la recherche agronomique
 ipdC::gfp : *indole-3-pyruvate decarboxylase::green fluorescent protein*
 IRIB : Institut de Recherche et d'Innovation Biomédicale
 ISR : *Induced Systemic Resistance*
 K⁺ : ion potassium
 Kdo : acide 2-céto-3-désoxy-D-manno-octulosonique
 KGF-R : *Keratinocyte-growth factor receptor*
 LABEX : Appel à projets Laboratoires d'Excellence
 LAR : *Local Acquired Resistance*
 LDU : Laboratoires dermatologiques d'Uriage
 Licence BCP : Licence Biologie Cellulaire et Physiologie

Licence B²MCP : Licence Biochimie, Biologie Moléculaire, Cellulaire et Physiologie
 Licence EBO : Licence Ecologie et Biologie des Organismes
 Licence Pro-CAB : Licence Professionnelle Contrôles Agro-Alimentaires et Biotechnologies
 LM1 : *Leeds Monoclonal 1*
 LMSM : Laboratoire de Microbiologie du Froid, Signaux et Microenvironnement
 m : mitochondrie
 MAMPs : *Microbe-Associated Molecular Patterns*
 MAP : *mitogen-associated protein*
 MAPKs : *Mitogen-Activated Protein Kinases*
 Master Biosciences ACE-ABI : Analyse, Contrôle et Expertise dans l'Agrochimie et les Bio-Industries
 Master Biosciences SV-EBV : Sciences du Végétal - Ecoproduction et Biovalorisation
 ME : Microscopie électronique
 MET : Microscopie électronique à transmission
 Mg²⁺ : ion magnesium
 MIA : Imagerie Ionique Analytique
 MIOXs : myo-inositol-oxygénases
 MO : microscopie optique
 MRE : Ministère de l'Enseignement et de la Recherche
 MUM4 : *Mucilage modified 4*
 MUR 3 : MURUS 3
 MUR 4 : MURUS 4
 MVB : *Multivesicular Body*
 N : noyau
 Na⁺ : ion sodium
 NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
 NB-LRR : *Nucleotide Binding-Leucine Rich Repeat*
 NBS : *nucleotide binding segment*
 NDP : Nucléotide Di-Phosphate
 NLRs : *Nod-like Receptors*
 NO : monoxyde d'azote
 Nod Factors : facteurs bactériens de nodulation
 Nt : N_{terminal}
 Nu : nucléole
 O₂⁻ : radical superoxyde
¹O₂ : oxygène singulet
 OGs : oligogalacturonides
 OHM : Observatoires Hommes-Milieus
 PAMs : peptides antimicrobiens
 PAMPs : *Pathogen-Associated Molecular Patterns*
 PATAg : *Periodic Acid -Thiocarbohydrazide - Ag proteinate*
 PEPRs : *Pep Receptors*
 Peps : *elicitor peptides*
 PER : Piège extracellulaire de racine
 PeReNE : *Peptide Research Network of Excellence*
P. fluorescens : *Pseudomonas fluorescens*
 PIRCE : *Peptide Investigation resource Center*
 PGA : *polygalacturonic acid*
 PGN : peptidoglycane
 PGPFs : *plant growth-promoting fungus*
 PGPRs : *plant growth-promoting rhizoacteria*
 PISSARO : Plateforme Instrumentale en Sciences Séparatives et Analytiques de Rouen
 PM : *Plasma Membrane*

PR : *pathogenesis related*
 PRIMACEN : Plateforme Régionale de Recherche en Imagerie Cellulaire de Haute-Normandie
 Pro : proline
 proPeps : *precursor proteins of elicitor peptides*
 PRRs : *Pathogen Recognizing Receptors*
P. sativum : *Pisum sativum*
 PS : Polysaccharide
 PTI : *Pattern-Triggered Immunity* ou *PAMP-Triggered Immunity*
 PVC : *Prevacuolar Compartment*
 qPCR : *quantitative polymerase chain reaction*
 QUA2 : QUASIMODO2
 RAM : *root apical meristem*
 RC : *root cap*
 R protein : *resistant protein*
 RE : Réticulum Endoplasmique
 RER : *Ruguous Endoplasmic Reticulum*
 RET : *Root Extracellular Trap*
 RGI : Rhamnogalacturonane I
 RGII : Rhamnogalacturonane II
 RGP : *Reversibly Glycosylated Peptides*
 RHMs : *tri-activity enzymes with UDP-Glc-4,6-dehydratase, UDP-4-keto-6-deoxy-D-Glc-3,5-epimerase, and UDP-4-keto-L-Rha-4-keto-reductase activities*
 RLI : *Relative Labeling Index*
 RLK : *Receptor Like Kinase*
 ROS : *Reactive Oxygen Species*
 RT : *root tip*
 RU : *rhamnogalacturonan oligosaccharides* [$\rightarrow 2$]- α -L-Rhap-($1 \rightarrow 4$)- α -D-GalpA-($1 \rightarrow$)
 SA : *Salicylic Acid*
 SAMP : *Symbiots-Associated Molecular Pattern*
 SAR : *Systemic Acquired Resistance*
S. aureus : *Staphylococcus aureus*
 SB : *stratum basale*
 SC : *stratum corneum*
 SDP : substance naturelle de défense des plantes
 SDS-PAGE : *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*
S. epidermidis : *Staphylococcus epidermidis*
 Ser : sérine
 SER : *Smooth Endoplasmic Reticulum*
 SG : *stratum granulosum*
 SIMS : *Secondary Ion Mass Spectrometry*
 SOSG : *Singlet Oxygen Sensor Green*
 SP : *stratum spinosum*
 SV : *Secretory Vesicle*
 SVT : Sciences de la Vie et de la Terre
 Sys : systémine
 T : transporteur
 TD : Travaux Dirigés
 TGN : *Trans Golgi Network*
 Thr : thréonine
 TIR : *Toll-interleukin 1 (IL-1) Receptor*
 TLRs : *Toll-like Receptors*
 TNF : *tumor necrosis factor*
 UAM : UDP-arabinose-mutases

UDP : uridine di-phosphate
UE : Unité d'Enseignement
UEo : Unité d'Enseignement d'orientation
UER1 : *bi-activity enzyme with UDP-4-keto-6-deoxy-D-Glc-3,5-epimerase and UDP-4-keto-L-Rha-4-keto-reductase activities*
UGDs : UDP-Glc-déshydrogénases
UGEs : UDP-Glc-4-épimérase/UDP-Gal-4-épimérase
UMI : Unité Mixte Internationale
UMR : Unité Mixte de Recherche
UPRES : Unité Propre de Recherche de l'Enseignement Supérieur
UXEs : UDP-xylose-4-épimérase
UXSs : UDP-GlcA-décarboxylases
V : vacuole
VASI : Végétal , Agronomie, Sols, Innovation
WAKs : *Wall-associated-kinases*
WAKL : *Wall-associated-like*
XyG : xyloglucane
Y2-H : *Yeast Two-Hybrid*
YC : fragment C_{terminal} de YFP
YFP : *Yellow Fluorescent Protein*
XT : xylosyltransférase
YN : segment N_{terminal} de YFP

Liste des Figures

- Figure 1 :** Organigrammes de la FRE 3090 au 1^{er} Janvier 2008, du laboratoire GlycoMEV de janvier 2009 à décembre 2011 et de janvier 2012 à décembre 2015.
- Figure 2 :** Description du projet « Caractérisation de la réponse des BLCs aux éliciteurs et pathogènes ».
- Figure 3 :** Morphologie des unités golgiennes de cellules végétales.
- Figure 4 :** Représentation schématique d'un empilement golgien illustrant le modèle de progression-maturation des citernes golgiennes et le trafic vésiculaire associé entre le RE, les unités golgiennes et le TGN.
- Figure 5 :** Organisation de la paroi primaire des plantes eu-dicotylédones.
- Figure 6 :** Structure du squelette de xyloglucane substitué par les chaînes latérales retrouvées chez les plantes *A. thaliana* et *P. sativum*.
- Figure 7 :** Structure schématique des principales chaînes pectiques.
- Figure 8 :** Synthèse et sécrétion des polysaccharides complexes végétaux.
- Figure 9 :** Etapes de biosynthèse des polysaccharides complexes au sein des empilements golgiens.
- Figure 10:** Localisation golgienne de l' $\alpha(1,5)$ -arabosyltransférase, ARAD1.
- Figure 11:** Schéma illustrant le principe de la technique de complémentation de fluorescence bi-moléculaire (*Bimolecular Fluorescence Complementation*, BiFC).
- Figure 12:** Schéma illustrant l'interconversion des nucléotide-sucre à partir de l'UDP- α -D-glucose (UDP- α -D-Glc) chez *Arabidopsis*.
- Figure 13:** Les cellules frontières des racines : origine et diversité morphologique.
- Figure 14:** « Modèle en zigzag » illustrant le fonctionnement du système immunitaire végétal.
- Figure 15:** Diversités des éliciteurs.
- Figure 16:** Morphologie cellulaire et subcellulaire des BLCs de lin et réponse à une élicitation bactérienne.
- Figure 17:** Structure de l'épiderme.
- Figure 18:** Interaction entre les immunités innée et adaptative en réponse à une infection bactérienne de la peau.
- Figure 19:** Récepteurs membranaires et intracellulaires impliqués dans la réponse immune innée chez les mammifères et les plantes.
- Figure 20 :** Isolement par microdissection laser de fractions épidermiques enrichies en cellules des couches basale et granuleuse.
- Figure 21 :** Analyses morphologiques par microscopie électronique à transmission et profil d'expression des gènes de défense cutanée par qPCR couplée à la microdissection laser.
- Figure 22 :** Structure des Arabinogalactanes protéines, AGPs.
- Figure 23 :** Représentation des rôles possibles des AGPs lors de l'interaction racine / microorganismes.
- Figure 24 :** Diversité des interactions plante(s)/microorganisme(s).
- Figure 25 :** Modèle de fonctionnement du piège extracellulaire de racine (PER) ou *Root Extracellular Trap* (RET).
- Figure 26 :** Morphologie des cellules frontières produites par l'apex de *Balanites aegyptiaca*.
- Figure 27 :** Cultures des plants de *Balanites aegyptiaca* en conditions hydroponiques au laboratoire.
- Figure 28:** Les éliciteurs peptidiques endogènes : séquence peptidique et implication dans les mécanismes de défense *in planta*.
- Figure 29:** Coiffe racinaire et épiderme : deux structures protectrices étonnamment semblables !

Liste des Tableaux

- Tableau 1** : Bilan des activités de responsabilités en recherche (Dr ML. Follet-Gueye).
- Tableau 2** : Encadrements d'étudiants de master recherche et de doctorat associés aux travaux de recherche décrits dans ce manuscrit. Dr ML. Follet-Gueye.
- Tableau 3** : Localisation d'épitopes associés aux polysaccharides (PS) complexes.
- Tableau 4** : Cartographie golgienne d'enzymes de synthèse des polysaccharides (PS) complexes par immunocytoologie indirecte *via* la GFP.
- Tableau 5** : Identification d'homo et hétérodimères potentiellement impliqués dans la synthèse du XyG et des ramifications des chaînes pectiques RGI.
- Tableau 6** : Doctorats et post-doctorat liés au projet de recherche présenté dans ce manuscrit.

Table des matières

1 – CURRICULUM VITAE	19
1-1 DEROULEMENT DE CARRIERE	19
1-2 TITRES ET DIPLOMES UNIVERSITAIRES.....	20
1-3 DOMAINES DE COMPETENCES TECHNIQUES.....	21
2 – ACTIVITES PEDAGOGIQUES.....	22
2-1 ACTIVITES D’ENSEIGNEMENT	22
2-2 RESPONSABILITES PEDAGOGIQUES ET ADMINISTRATIVES.....	22
3 – ACTIVITES D’ENCADREMENT	23
3-1 ENCADREMENT POST-DOCTORAL.....	23
3-2 ENCADREMENT DOCTORAL.....	23
3-3 MASTER 2 RECHERCHE ET PROFESSIONNEL	23
3-4 MASTER 1 RECHERCHE ET PROFESSIONNEL	24
3-5 ENCADREMENTS PONCTUELS D’ETUDIANTS ET COLLABORATIONS INTERNATIONALES.....	24
4 – ACTIVITES DE RECHERCHE ET DE VALORISATION	26
4-1 PARTICIPATION A DES JURYS DE THESE	26
4-2 ACTIVITES DE RESPONSABILITES AU SEIN DE LA PLATEFORME PRIMACEN	26
4-3 ACTIVITES DE RESPONSABILITES EN RECHERCHE.....	27
4-4 DEMANDES DE FINANCEMENT DE PROJETS.....	29
4-5 COLLABORATIONS AVEC DES INDUSTRIELS.....	30
4-6 COLLABORATIONS NATIONALES ET INTERNATIONALES	30
4-7 ORGANISATION DE COLLOQUES ET CONFERENCES.....	31
4-8 PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES	31
4-8-1 <i>Articles publiés dans des revues à comité de lecture (ACL01-16)</i>	31
4-8-2 <i>Articles soumis dans des revues à comité de lecture (ACL 17)</i>	33
4-8-3 <i>Chapitres d’ouvrages scientifiques (OS01-04)</i>	33
4-8-4 <i>Articles dans des revues de vulgarisation scientifique</i>	33
4-8-5 <i>Conférences données sur invitation (INV01-05)</i>	33
4-8-6 <i>Communications dans des congrès nationaux et internationaux</i>	34
5 – TRAVAUX DE RECHERCHE	37
5-1 DOCTORAT ET POST-DOCTORAT – UNIVERSITES DE ROUEN ET PARIS 7 (1994-1999)	37
5-2 ENSEIGNANT-CHERCHEUR – UNIVERSITE DE ROUEN (2000-2013).....	38
5-2-1 <i>Organisation fonctionnelle de l’appareil de Golgi des plantes supérieures en lien avec la biosynthèse des polysaccharides pariétaux</i>	39
5-2-2 <i>Implication des cellules apparentées aux cellules bordantes dans les interactions plante(s)- pathogène(s)</i>	51
5-2-3 <i>Glycomolécules végétales et immunité cutanée en lien avec l’écologie microbienne de la peau</i>	57
6 – PROJET DE RECHERCHE	65
6-1 GLYCOMOLECULES PARIETALES ET SIGNALISATION.....	65
6-1-1 LES OLIGOGALACTURONIDES (OGS).....	65
6-1-2 LES ARABINOGALACTANES PROTEINES (AGPs)	66
6-2 INTERACTIONS BIOTIQUES AU SEIN DE LA RHIZOSPHERE	71
6-2-1 <i>Le microbiome rhizosphérique</i>	71
6-2-2 <i>Cellules frontières et exsudats racinaires : mise en place d’un Piège Extracellulaire de Racine (PER) ou Root Extracellular Trap (RET)</i>	72
6-2-3 <i>Interactions biotiques au sein de la rhizosphère de <i>Balanites aegyptiaca</i>, essence ligneuse de la Grande Muraille Verte (GMV)</i>	73
6-3 EFFETS DE PEPTIDES ET GLYCOPEPTIDES VEGETAUX DANS LE RENFORCEMENT DE LA BARRIERE CUTANEE	80
6-3-1 <i>Contexte de l’étude</i>	80
6-3-2 <i>Description du projet</i>	82
7 – CONCLUSIONS	83
8 – REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	83
9 – ANNEXE 01 : PRINCIPALES PUBLICATIONS	83
10 – ANNEXE 02 : APPEL A PROJET POUR CONTRAT DOCTORAL.....	83

1 – Curriculum vitae

Marie-Laure FOLLET-GUEYE

43 ans
Mariée, 1 enfant
Nationalité : Française

Maître de Conférences - Physiologie Végétale

Section 66 (Physiologie) du CNU

Laboratoire Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale (GlycoMEV-EA 4358),
Plateforme d'Imagerie Cellulaire de Haute Normandie (PRIMACEN),
Université de Rouen

Bâtiment Henri Gadeau de Kerville
UFR des Sciences - Université de Rouen
76821 Mont-Saint-Aignan CEDEX – France
tél : 02 35 14 00 39

email : marie-laure.follet-gueye@univ-rouen.fr

1-1 Déroulement de carrière

Depuis Septembre 1999 : Maître de Conférences

Enseignement : Physiologie et Biologie Végétales ; Biologie Cellulaire

UFR des Sciences et Techniques, Département de Biologie, Université de Rouen

Recherche : Biologie Cellulaire et Imagerie

Laboratoire Glycobiologie et Matrice extracellulaire Végétale (Glyco-MEV) - UPRES-EA 4358

Directeurs de l'Unité : Pr Patrice Lerouge - Pr Azeddine Driouich
UFR des Sciences et Techniques, Université de Rouen.

Plateforme Régionale de Recherche en Imagerie Cellulaire de Haute-Normandie (PRIMACEN)

Service Microscopie Electronique à Transmission.

Responsables du service : Pr Azeddine Driouich – **Dr Marie-Laure Follet-Gueye**

Depuis Octobre 2012 : Sélection de nouvelles Substances naturelles de Défense des Plantes (SDP) et caractérisation des réponses moléculaires

- Etudes macroscopique et microscopique des effets de substances naturelles (SDP potentielles) sur le phénotype de plantules de lin (*Linum usitatissimum*), et sur les mécanismes de défense induits (production de ROS, callose, extensine, lignines).
- Analyses transcriptomique et protéomique ciblées (protéines PR, *pathogenesis related proteins*) après élicitation par les SDP sélectionnées.
- Détermination de l'impact des SDP sur l'amélioration de la résistance des plantes. Pathosystème étudié : Lin/*Fusarium oxysporum*.

Depuis Décembre 2009 : Effets de polymères pariétaux sur la défense de la peau en lien avec la flore cutanée

- Analyses morphologiques à l'échelle ultrastructurale des assises épidermiques d'explants de peau humaine stimulés ou non par des bactéries commensales de la flore cutanée. Approches par congélation haute pression - cryodéshydratation et Microscopie Electronique à Transmission (MET).
- Analyses transcriptomiques ciblées de gènes de défense cutanée par qPCR, sur des fractions d'épiderme isolées par microdissection laser en lien avec le microbiome cutané.
- Effets de polymères riches en rhamnose sur les paramètres étudiés précédemment.

Depuis Septembre 2009 : Caractérisation morphologique des cellules bordantes de racines

- Morphologie ultrastructurale des cellules bordantes (*Border cells*, BCs) ou cellules apparentées (*Border-like cells*, BLCs) chez les plantes supérieures (*Arabidopsis*, pois et lin) par Microscopie Electronique à Transmission (MET).
- Modification ultrastructurale et immunolocalisation de composés pariétaux après élicitation des BCs et BLCs.

Depuis Septembre 2000 : Caractérisation fonctionnelle de l'appareil de Golgi chez les végétaux

- Cartographie sub-golgienne de glycosyltransférases de la voie de N-Glycosylation des végétaux supérieurs (*Nicotiana tabacum*) par MET.
- Cartographie sub-golgienne des enzymes de biosynthèse des polysaccharides pariétaux chez les végétaux supérieurs (*Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum*) par MET.
- Mise en évidence de complexes multienzymatiques de synthèse des polysaccharides associés au Golgi chez les modèles végétaux *Arabidopsis* et tabac.

Janvier 1999 - Juillet 1999 : Contrat post-doctoral

« Recherche de marqueurs pariétaux de la différenciation des dérivées cambiales chez une espèce de peuplier : le tremble. Approches immunocytochimique et biochimique. »

Laboratoire d'Enzymologie en Milieu Structuré, Institut Jacques Monod, Université Paris 7, France.
Responsable : Pr Renée Goldberg.

Septembre 1996 - Août 1998 : Contrats ATER

« Distribution du calcium et des polysaccharides dans les parois cambiales de jeunes rameaux de hêtre. Approche par Microscopie Ionique Analytique et Microscopie Electronique à Transmission. »

Laboratoire des Processus Ioniques Cellulaires, UPRES A CNRS 6037, UFR des Sciences et Techniques de Rouen, Mont-Saint-Aignan, France.

Responsable : Pr Camille Ripoll.

1-2 Titres et diplômes universitaires

Décembre 1993 – Novembre 1997 Doctorat de Biologie Végétale

Thèse obtenue le 14 Novembre 1997, Université de Rouen, France.

Bourse MRE / contrat ATER

Laboratoire des Processus Ioniques Cellulaires, UPRES A CNRS 6037, UFR des Sciences et Techniques de Rouen, Mont-Saint-Aignan, France. Directeur de thèse : Pr Camille Ripoll.

« Relations ioniques dans l'activité cambiale et la xylogénèse : Approche par microscopie ionique analytique. »

Septembre 1992 – Juillet 1993 DEA Sciences du bois

Laboratoire de Chimie Organique 4, Faculté des Sciences de Nancy II. « Réactivité chimique des résidus ligneux ». Directeur de DEA : Pr Bernard Loubinoux.

1991-1992 Maîtrise Biologie Végétale – Université de Tours

1990-1991 Licence Biologie Cellulaire et Physiologie – Université de Tours

1988-1990 DUT Biologie Appliquée – Université de Tours

1-3 Domaines de compétences techniques

Techniques d'imagerie

Préparations d'échantillons biologiques pour analyses microscopiques :

-Préparations chimiques conventionnelles

-Cryopréparations: Congélation Haute Pression et Cryodéshydratation / Cryoultramicrotomie

2-11 Juillet 2003: Workshop for Cryomethods – Ultramicrotomy and Immunolabeling University Medical Center Utrecht, The Netherlands

24-25 Juin 2002: Cryomethods and immunocytochemistry in electron microscopy. Joint Microscopy Meeting Lille.

11-12 Décembre 2002: Formation sur les immunomarquages à l'or – Société BIOVALLEY Paris, Université Pierre et Marie Curie.

Microscopies :

-Microscopie Optique (épifluorescence, contraste de phase, lumière polarisée, contraste interférentiel, balayage laser confocal).

-Microscopie Electronique à Transmission.

Analyses histo-cytochimiques :

-Marquages chimiques : contraste PATAg, acétate d'uranyle, citrate de plomb. Coloration chimique des polymères pariétaux (cellulose, callose, lignine).

-Marquage par affino-détection : immunocytochimie (protéines et polysaccharides), marquage à l'Or-cationique, couplage enzyme-Or colloïdal.

-Acquisition et traitement d'images numérisées : analyses statistiques appliquées aux marquages immunogold (test Khi-2, détermination indice relatif de marquage ou *Relative labeling index*, RLI).

Techniques de biochimie :

-Extraction et fractionnement des polysaccharides pariétaux

-Dosages colorimétriques des polysaccharides

-Chromatographie phase gazeuse (CPG)

-Electrophorèse SDS-PAGE

-Techniques d'immuno-empreinte.

2 – Activités pédagogiques

2-1 Activités d'enseignement

Depuis Septembre 1999 : Maître de Conférences - Université de Rouen

Matières enseignées : Biologie cellulaire, Génétique mendélienne, Biologie et Physiologie Végétales, Techniques et Analyses microscopiques.

Niveaux enseignés : Licence 1 SVT, Licence 2 SVT, Licence 3 SVT BCP/B²MCP, Licence 3 SVT EBO, Licence Pro-CAB ;
Master 1 Biosciences ACE-ABI, M1 et M2 Sciences du Végétal-EcoBioValo ;
Master Professionnel Imagerie 1 et 2.

Depuis Septembre 2009 : Vacataire, Ecole d'Ingénieurs Esitpa, Mont-St-Aignan.

Matière enseignée : Biologie Végétale.

Niveau enseigné : Première année.

Volume horaire : Cours magistraux : 10h.

Septembre 1996 - Août 1998 : Contrats ATER (2×96h équivalent TD) - Université de Rouen
Travaux pratiques et dirigés de Physiologie Végétale.

Septembre 1994 – Août 1996 : Vacataire (80h équivalent TD) – Université de Rouen

Travaux dirigés de Biologie Cellulaire, Génétique.

Travaux pratiques de Physiologie Végétale.

2-2 Responsabilités pédagogiques et administratives

Depuis Mai 2012 : **Vice-présidente de la Commission Consultative de Spécialistes d'Etablissement** 66-67-69^{èmes} sections – Université de Rouen.

Depuis Septembre 2012 : **Responsable UEo (Unité Enseignement d'orientation) 5-6, L3 B²MCP**
« Phytohormones et productions végétales ».

Co-responsable UE VEG11

Master 2 Biologie Santé-Sciences du Végétal EcoBiovalo.

Depuis Janvier 2009 : **Membre du Jury d'évaluation du Master 2 Recherche**

Ecole doctorale Normande (Biologie intégrative, Santé, Environnement).

Septembre 2009 - Août 2010 : **Responsable pédagogique** du parcours EBO en seconde année de licence.

Septembre 2005 – Août 2009 : Coordinatrice pour le **département de Biologie** des travaux de réhabilitation du bâtiment Lémery .

Septembre 2005 – Juin 2006 : **Responsable pédagogique** du parcours EBO en seconde année de licence : élaboration et suivi grille horaire.

Mai 2005 – Juin 2008 : Membre élue de la **commission de spécialistes** 66-69^{èmes} sections – Université de Rouen.

Mai 2004 - Juin 2007 : Membre nommée du **conseil de département de Biologie.**- Université de Rouen.

3 – Activités d'encadrement

Au cours de mes activités de recherche et d'enseignement, j'ai encadré et/ou co-encadré **25 étudiants** : 5 doctorats, 11 masters, 3 Licences (L3) et 6 stagiaires étrangers ; et **un post-doctorant**.

3-1 Encadrement post-doctoral

Depuis le 01 Juin 2013 : **Dr Abderrakib Zahid** en contrat post-doctoral à l'Université de Rouen. « Effet de peptides et glycopeptides végétaux sur la défense cutanée innée ». Programme Interreg IV, *Peptide Research Network of Excellence* (PeReNE).

Encadrants : Pr A. Driouich (50%) ; **Dr ML. Follet-Gueye (50%)**.

3-2 Encadrement doctoral

A partir d'Octobre 2013 : **Recrutement en cours**. « Déterminisme biotique de l'émergence de la pourriture racinaire du pois et impact d'agents de bio-contrôle » ; Bourse d'allocation régionale de recherche.

Encadrement : Dr C. Gangneux (50%), **Dr ML. Follet-Gueye (50%)**.

Doctorat en cours : **Rim Jaber**. « Sélection de nouvelles Substances naturelles de Défense des Plantes (SDP) et caractérisation des réponses moléculaires » ; Bourse d'allocation régionale de recherche.

Directeurs de thèse : Pr JC. Mollet (50 %) ; **Dr ML. Follet-Gueye (50%)**.

Doctorat en cours : **Sophie Bernard**. « Existence de complexes enzymatiques golgiens de synthèse des chaînes pectiques rhamnogalacturonanes de type I, RGI » ; Ingénieur d'étude Service ME, PRIMACEN.

Directeurs de thèse : Pr A. Driouich (50 %) ; **Dr ML. Follet-Gueye (50%)**.

Décembre 2009 - Décembre 2012 : **Dr Giuseppe Percoco**. « Biomolécules et Immunité cutanée en lien avec l'écologie microbienne de la peau » ; Programme FUI, SkinOFlor, pôle de compétitivité de la *Cosmetic Valley*.

Directeurs de thèse : Pr A. Driouich (50 %) ; **Dr ML. Follet-Gueye (50%)**.

Septembre 2004 - Juin 2008 : **Dr Laurence Chevalier**. « Développement de cryométhodes en MET : application à l'étude de l'appareil de Golgi dans la synthèse de polysaccharides matriciels chez les plantes supérieures » ; Formation continue EPHE – Université de Rouen.

Directeurs de thèse : Pr A. Driouich (50%) ; **Dr ML. Follet-Gueye (50%)**.

3-3 Master 2 Recherche et Professionnel

Septembre 2011 – Juillet 2012 : **Rim Jaber**. Master 2 Recherche, Sciences, Technologie, Santé, spécialité biologie cellulaire, parcours sciences végétales. « Implication des cellules apparentées aux cellules bordantes dans la défense racinaire : étude du pathosystème *Linum usitatissimum* – *Fusarium oxysporum* ».

Encadrants : Dr M. Vicré-Gibouin (50%) ; **Dr ML. Follet-Gueye (50%)**.

Septembre 2008 – Juillet 2009 : **Romain Lamour**. Master 2 Recherche, Sciences, Technologie, Santé, spécialité biologie cellulaire, parcours sciences végétales. « Synthèse des polysaccharides pariétaux : mise en évidence de complexes multi-enzymatiques golgiens ».

Encadrants: Pr A. Driouich (50%) ; **Dr ML. Follet-Gueye (50%)**.

Février 2009 – Septembre 2009 : **Yasmina Ramdani**. Master 2 Professionnel, Imagerie pour la biologie. « Cartographie subcellulaire des pectines de type homogalacturonane chez *Nicotiana tabacum* par microscopie confocale et microscopie électronique à transmission ».

Encadrant : **Dr ML. Follet-Gueye (100%)**.

Février 2008 – Septembre 2008 : **Julie Gonand**. Master 2 Professionnel, Imagerie pour la Biologie. « Etude microscopique de l'organisation fonctionnelle de l'appareil de Golgi dans les cellules végétales ».

Encadrant : **Dr ML. Follet-Gueye (100%)**.

Février 2006 – Juillet 2006 : **Clément Laigle**. Master 2 Professionnel, Imagerie pour la Biologie. « Localisation immunocytochimique de protéines par microscopie électronique à transmission *via* la *Green Fluorescent Protein*, GFP ».

Encadrant : **Dr ML. Follet-Gueye (100%)**.

Septembre 2005 – Juillet 2005 : **Sophie Bernard**. Master 2 Recherche, Sciences, Technologie, Santé, spécialité biologie cellulaire, parcours sciences végétales. « Compartimentation golgienne d'une enzyme de synthèse des polysaccharides complexes ».

Encadrants : Pr A. Driouich (50%) ; **Dr ML. Follet-Gueye (50%)**.

Septembre 2000 – Juillet 2001 : **Ji-Young Lee**. DEA de Biologie cellulaire, option systèmes intégrés. « *Emezzy*, un nouveau mutant de lin présentant un défaut d'élongation cellulaire ».

Encadrants : Pr A. Driouich (50%) ; **Dr ML. Follet-Gueye (50%)**.

3-4 Master 1 Recherche et Professionnel

Avril 2013 – Juin 2013 : **Charles Bocquier**. Master 1 Recherche et Professionnel, BioSciences, Sciences du végétal, Écoproduction et biovalorisation. « Implication de la racine dans la tolérance au stress hydrique : caractérisation des cellules frontières produites par les racines de deux plantes africaines, *Balanites aegyptiaca* et *Acacia senegal* ».

Encadrant : Dr M. Viché-Gibouin (50%) ; **Dr ML. Follet-Gueye (50%)**.

Avril 2013 – Juin 2013 : **Sonia His**. Master 1 Recherche et Professionnel, BioSciences, Sciences du végétal, Écoproduction et biovalorisation. « Caractérisation des Arabinogalactanes Protéines de graines de *Neem*, *Azadirachta indica* : effet sur l'expression de gènes de défense de lignées humaines de kératinocytes ».

Encadrant : **Dr ML. Follet-Gueye (100%)**.

Avril 2003 – Juin 2003 : **Ibrahima Youm**. Maîtrise de Biologie cellulaire et Physiologie. « Influence des métaux lourds sur la quantité et la qualité des protéines de réserve et pariétales et sur celles des sucres de réserve et pariétaux du Lin oléagineux (variétés Astral et Oliver) ».

Encadrants : Pr A. Driouich (50%) ; **Dr ML. Follet-Gueye (50%)**.

Juin 2001 – Septembre 2001 : **Florence Martin**. Maîtrise de Sciences et Techniques de Biologie et Physiologie Appliquées. « Localisation ultrastructurale de protéines recombinantes dans des suspensions cellulaires de tabac ».

Encadrant : **Dr ML. Follet-Gueye (100%)**.

3-5 Encadrements ponctuels d'étudiants et collaborations internationales

01 Juin – 31 Juillet 2012 : **Abdel Dihazi**, étudiant en doctorat, Université de Marrakech. « Caractérisation des parois cellulaires des racines du palmier dattier ; approches biochimiques et immunocytochimiques ; Etude du pathosystème Palmier dattier /*Fusarium* ».

Encadrants : **Dr ML. Follet-Gueye (50%)** ; Dr M. Viché-Gibouin (50%).

20 Juin - 26 Août 2011 : **Saadet Büşra Aksoyer** et **Seren Dayi**, étudiantes en licence, *Marmara University*, Turquie. « Caractérisation racinaire d'un mutant de paroi chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana* ».

Encadrants : **Dr ML. Follet-Gueye (50%)** ; Dr M. Vicré-Gibouin (50%).

21 Février – 25 Mars 2011 : **Sumaira Kousar**, étudiante en doctorat, Université de Grenoble. « Immuno-caractérisation d'un mutant pectique d'*Arabidopsis* »

Encadrant : **Dr ML. Follet-Gueye (100%)**.

15 Mai – 31 juillet 2010 : **Patricia Corall**. Université de Valencia, Espagne. « Glyco-imaging in rapeseed microspore cultures ».

Encadrants : **Dr ML. Follet-Gueye (50%)** ; Sophie Bernard (50%).

01 Septembre 2008 – 30 Juin 2009 : **Nahla Dhen**. Institut National des Sciences Appliquées et de Technologie (INSAT), Tunis, Tunisie. « Caractérisation biochimique du xyloglucane chez la lignée Bright Yellow-2 de *Nicotiana tabacum* ».

Encadrants : Pr P. Lerouge (50%) ; **Dr ML. Follet-Gueye (50%)**.

15 Mai - 30 Juin 2003 : **Ignacio Martin**. Université de Salamanca, Espagne. « Immunolocalisation des composés pectiques dans l'hypocotyle de plantules de pomme de terre surexprimant une β -galactosidase de pois. »

Encadrant : **Dr ML. Follet-Gueye (100%)**.

4 – Activités de recherche et de valorisation

4-1 Participation à des jurys de thèse

16 Juillet 2013 : Thèse de doctorat de l'Université du Havre présentée par **Bah Mohamed-Lemine Abellahi** : « Caractérisation chimique et physicochimique de la résine du *Commiphora africana* d'origine mauritanienne en vue de sa valorisation ».

Participation en qualité d'examineur.

11 Décembre 2012 : Thèse de doctorat de l'Université de Rouen présentée par **Giuseppe Percoco** : « Biomolécules et Immunité cutanée en lien avec l'écologie microbienne de la peau ».

Participation en qualité d'examineur.

16 Juin 2008 : Thèse de doctorat de l'Université de Rouen présentée par **Laurence Chevalier** : « Développement de cryométhodes en MET : application à l'étude de l'appareil de Golgi dans la synthèse de polysaccharides matriciels chez les plantes supérieures ».

Participation en qualité d'examineur.

4-2 Activités de responsabilités au sein de la plateforme PRIMACEN

Le Pr Azeddine Driouich crée en **2000 le Centre Commun de Microscopie Electronique (CCME)**. Ayant intégré l'équipe dirigée par le Pr A. Driouich en janvier 2000, j'ai activement participé au développement scientifique et technique du centre. J'ai ainsi suivi et accompagné l'installation du MET Technai FEI Bio-twin en Juillet 2000. De plus, j'ai accompagné le Pr A. Driouich dans les démarches administratives et scientifiques aboutissant à l'achat du système de congélation haute pression, EMPact1, Leica.

En **2001**, le CCME sera l'un des membres fondateurs de l'actuelle **plateforme régionale d'imagerie cellulaire PRIMACEN**, labellisée RIO en 2001, puis IBISA depuis 2008, et qui comprend outre le service Microscopie Electronique (ME), 5 autres services. Le service ME se spécialise dans le développement des techniques alternatives de **cryopréparations** des échantillons biologiques, techniques les plus performantes pour les analyses d'échantillons en MET. Je contribue à ces développements technologiques en suivant notamment plusieurs formations nationales et internationales dédiées à ces approches au cours des années 2002 et 2003.

De **Janvier 2001 à Janvier 2008**, l'équipe technique du service ME est constituée d'une technicienne (**Figure 1A**), Mme Laurence Chevalier (50% service ME/PRIMACEN - 50% Recherche UMR 6037 CNRS). J'assure sa **formation**, son **encadrement scientifique et technique**. Je participe à toutes les discussions relatives aux études confiées au service (rencontre avec les utilisateurs, élaboration des devis de prestations ou des collaborations de recherche, suivis des études et validations des résultats). Mme Laurence Chevalier, agent CNRS initialement recrutée en tant que technicienne accède successivement au grade d'assistant ingénieur puis d'ingénieur d'études, et soutient en Juin 2008 sa thèse dont je suis co-directeur.

Au 1^{er} Janvier 2008, l'équipe technique du service ME est constituée de 2 ingénieurs d'études CNRS (**Figure 1A**), Mme Laurence Chevalier (50% service ME/PRIMACEN - 50% Recherche UMR 6037 CNRS) et Mr Fabrice Richard (100% service ME, PRIMACEN), et peut ainsi mieux répondre aux demandes des nombreux utilisateurs. Les utilisateurs du service sont non seulement des usagers académiques (doctorants, post-doctorants, chercheurs : Université de Rouen, autres universités françaises, européennes ou non européennes), mais également des entreprises du secteur privé.

Suite aux restructurations du laboratoire FRE CNRS 3089, qui devient EA 4358 au 1^{er} Janvier 2009 (Laboratoire co-fondé par les Pr P. Lerouge et A. Driouich), les ingénieurs d'études CNRS constituant l'équipe technique du service, sont contraints de quitter la plateforme PRIMACEN (**Figure 1B**). Une

CRCT de 6 mois (**Janvier 2009-Août 2009**) m'est alors accordée à titre exceptionnel afin que je puisse assurer **la gestion scientifique et technique du service à plein temps**. Durant cette CRCT, j'ai pour mission principale de suivre les études en cours et plus spécifiquement de veiller à ce que les travaux des doctorants aboutissent dans les délais requis.

Au **1^{er} Janvier 2010**, je suis **co-responsable du service ME**, et suis notamment impliquée dans la mise en œuvre de demandes de financements CPER et FEDER aboutissant à l'achat de nouveaux équipements et/ou à la prise en charge de contrats de maintenance des équipements du service. Durant l'année 2010 (**Figure 1C**), j'établis une demande de recrutement d'un nouvel ingénieur d'étude (négociation conduisant à la création du poste IE, élaboration fiche de poste et suivi du processus de recrutement). Au 15 Septembre 2011, Melle Sophie Bernard est recrutée IE 2^{nde} classe (50% service ME, PRIMACEN – 50% EA 4358, GlycoMEV) et assure sous la co-responsabilité scientifique du Pr A. Driouich et de moi-même la gestion du service.

4-3 Activités de responsabilités en recherche

J'exerce mes activités de recherche au sein du laboratoire Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale (GlycoMEV) UPRES-EA 4358 de l'Université de Rouen. En Janvier 2000, je rejoins **l'équipe du Pr A. Driouich « Polysaccharides et Arabinogalactanes Protéines, AGPs »**, équipe alors membre du laboratoire « **Glycobiologie et Transport Chez les Végétaux-UMR 6037** » dirigé par le **Dr L. Faye**.

Tableau 1 : Bilan des activités de responsabilités en recherche (Dr ML. Follet-Gueye).

Année	Titre du projet	Fonction	Laboratoire
2008	Organisation en complexes des enzymes golgiennes de biosynthèse des polysaccharides chez les plantes supérieures	Porteur	FRE 3090 (Figure 1A)
2009-2011	Organisation sub-cellulaire des enzymes golgiennes	Porteur	UPRES-EA 4358, GlycoMEV (Figure 1B)
Déc. 2009 - Déc 2012	SkinOFlor: Pôle de Compétitivité <i>Cosmetic-Valley</i> : «Produits cosmétiques bioactifs, végétaux ou autres, en lien avec l'écologie microbienne. Etude des impacts ultrastructuraux et moléculaires en relation avec la défense des cellules de la peau ».	Co-porteur	UPRES-EA 4358, GlycoMEV
2012-2015	Caractérisation de la réponse des BLCs aux éliciteurs et pathogènes.	Co-porteur	UPRES-EA 4358, GlycoMEV (Figures 1C et 2)

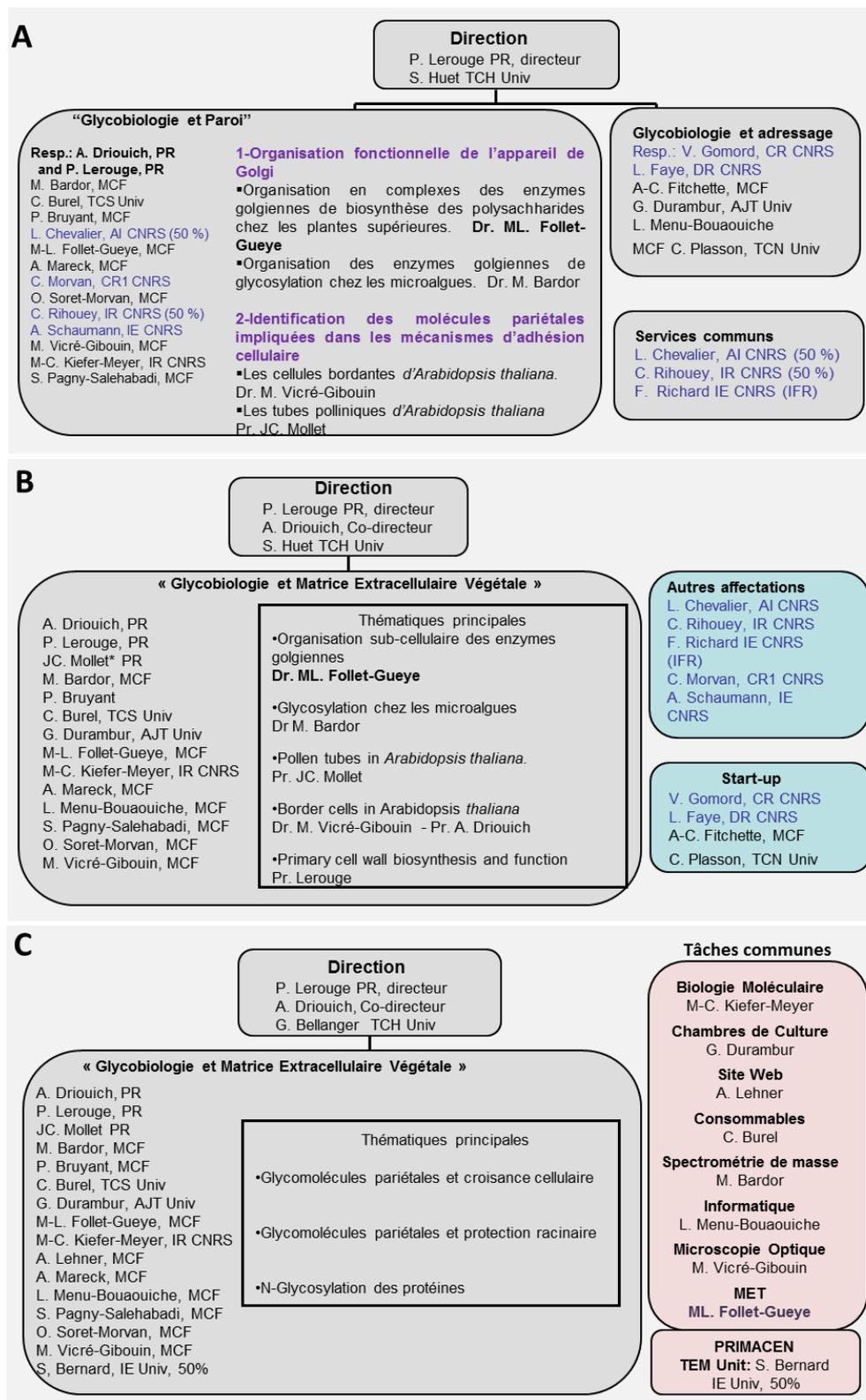


Figure 1 : Organigrammes de la FRE 3090 au 1^{er} Janvier 2008 (A), et du laboratoire GlycoMEV de janvier 2009 à décembre 2011 (B) et de janvier 2012 à décembre 2015 (C). Ces documents sont extraits du dossier de demande de labellisation 2012-2015 du laboratoire GlycoMEV-EA 4358 (évaluation décembre 2011).



Membres	Project: The effects of the microbe-derived molecules called MAMPS, flg22 (flagellin peptide 22) and PGN (peptidoglycan from <i>B. subtilis</i>), that have been recently shown to trigger tissue-specific responses in <i>Arabidopsis</i> roots (Millet et al., 2010) as well as the pathogenic and non-pathogenic bacteria, <i>Pseudomonas syringae</i> DC3000 and <i>Rhizobium alamii</i> , will be assessed on BLC (collaboration with Dr. C. Santaella, CEA / CNRS / University of Marseille). More specifically, we will investigate the time-lapse impact of a treatment with elicitors and pathogen on BLC production, viability and morphology using microscopy and flow cytometry. We will use specific fluorescent probes and confocal microscopy to examine the production of reactive oxygen species (ROS) and wall molecules such as callose or extensin. Further cell wall alterations will be investigated using microscopy, Fourier Transform Infrared (FT-IR) microspectrometry and chemical analysis. Laser microdissection will be used to isolate BLC for cell wall chemical analysis and also for studying defence genes expression (PR1, THI2.1, PDF1.1). To explore further the response of BLC, metabolomic analyses on microdissected cells will be undertaken to assess possible changes in small molecule metabolites produced upon elicitors/pathogen treatment (collaboration with Pr. E. Gontier, University of Picardie, Amiens).
Publications	
Pôles de compétitivité	
Contrats & Partenaires	
Collaborations internationales	
Compétences techniques	
Master/Doctorat	
Plan d'accès	
English version	

Figure 2 : Description du projet « Caractérisation de la réponse des BLCs aux éliciteurs et pathogènes ». Site web GlycoMEV, <http://www.univ-rouen.fr/Glyco-MEV/PagesProjetsfrench/Vicregibouintopic.html>.

4-4 Demandes de financement de projets

Demandes de financements régionaux :

1-GRR Chimie Biologie Santé (CBS), Institut Fédératif de Recherches Multidisciplinaires sur les Peptides 23 (IFRMP23).

Programme Dynacell, coordinateur principal, Dr L. Galas. Financement équipement pour le service ME (microscope optique inversé pour salle de culture) et fonctionnement (2009-2010).

Responsables : Pr A. Driouich – **Dr ML. Follet-Gueye**.

Montant : 7500€ (équipement) + 1335€ (fonctionnement).

2-GRR Végétal, Agronomie, Sol, Innovation (VASI).

Financement thèse Rim Jaber (Octobre 2012-Octobre 2015) et soutien financier.

Directeurs de thèse Pr JC. Mollet – **Dr ML. Follet-Gueye**.

Fonctionnement : 35 000€.

3- GRR Chimie Biologie Santé (CBS), Institut Fédératif de Recherches Multidisciplinaires sur les Peptides 23 (IFRMP23).

Financement technicien microscopie Jessica Le Bars (Février 2013-Décembre 2013) et équipement (système de congélation haute pression et platine froid).

Responsables : **Dr ML. Follet-Gueye** – Pr A. Driouich.

Montant total (CPER - FEDER) : 345 396 €.

4-Programme FUI, pôle de compétitivité de la *Cosmetic Valley* : projet SkinOFlor.

Financement thèse Giuseppe Percoco (Décembre 2009-Décembre 2012)

Financement Ingénieur d'étude Yasmina Ramdani (Décembre 2009 – Juin 2012) et fonctionnement.

Responsables Pr A. Driouich - **Dr ML. Follet-Gueye**.

Montant total (FEDER - Région Haute-Normandie): 314 107 €.

Demande de financements nationaux :

-**projet Peptide Investigation ressource Center, PIRCE.** Porteur du projet : Dr D. Vaudry
Demande d'équipement pour le service ME de la plate forme d'imagerie PRIMACEN.
Responsables : Pr A. Driouich - **Dr ML. Follet-Gueye.**
Projet non retenu.

Demandes de financements internationaux :

-**Programme Interreg IV France (Manche) – Angleterre : Projet Peptide Research Network of Excellence, PeReNE.** Porteurs du projet: Dr D. Vaudry et Pr A. Driouich.
Financement post-doctoral Dr Abderrakib Zahid (Juin 2013-Septembre 2014) et fonctionnement.
Responsables : Pr A. Driouich - **Dr ML. Follet-Gueye.**
Montant total : 209 500 €.

4-5 Collaborations avec des industriels

Laboratoires dermatologiques d'Uriage (LDU) : Dr Luc Lefevre, 92400 Courbevoie. Morphologie de formulations dermocosmétiques par MET (projet SkinOFlor).

Laboratoire Bio-EC : Dr Elian Lati, 91165 Longjumeau. Ultrastructure des cellules épidermiques d'explants de peau humaine maintenus en survie.

Laboratoire Bio-Europe (Groupe Solabia) : Dr Florent Yvergnaux et Dr Thibaut Saguet, 28260 Anet. Effet stimulant de polysaccharides riches en rhamnose sur la défense cutanée de type inné.

Danone Research, France: Dr Fanny LARRERE, 91120 Palaiseau. Effet encapsulateur du glutaraldéhyde sur les bactéries dans une matrice laitière.

ROQUETTE FRERES SA: Cossart Matthieu, 62136 Lestrem cedex. Observation ultrastructurale par Microscopie Electronique à Transmission de différentes souches de chlorelle.

4-6 Collaborations nationales et internationales

Dr Deborah Goffner : CNRS UMI 3189, Environnement, Santé, Sociétés, Sénégal. « Interactions biotiques au sein de la rhizosphère d'espèces végétales de la grande muraille verte (GMV) ».

Dr Geneviève Grundmann :

UMR 5557, Laboratoire d'Ecologie Microbienne, Université Claude Bernard Lyon I, «Etude des interactions entre les cellules frontières de racine et deux bactéries PGPRs modèles : *Pseudomonas* et *Azospirillum* ».

Dr Fabienne Guillon: INRA Nantes, Biopolymères Interactions Assemblages. « Immuno-localisation des composés pectiques lors de la maturation du grain de Blé ».

Dr Olivier Lerouxel: Laboratoire CERMAV, Glycobiologie Moléculaire, Université de Grenoble. « Identification de glycosyltransférases impliquées dans la synthèse des polysaccharides complexes ».

Pr Silvia Coimbra : Université de Porto, Departamento de Biologia, Faculdade de Ciências, Porto, Portugal. « Immunolocalisation of Arabinogalactan proteins in Arabidopsis pollen tube ».

- Dr Yumiko Sakuragi:** Laboratory for Molecular Plant Biology, VKR Research Centre Pro-Active Plants, Department of Plant Biology and Biotechnology, University of Copenhagen, Denmark. "Mise en évidence de complexes multienzymatiques golgiens impliqués dans la synthèse de polysaccharides ».
- Pr Jose Maria Segui:** Université de Valencia, Espagne. "Glyco-imaging in rapeseed microspore cultures".
- Dr. Michel Simon :** UMR 5165, CNRS, Université Toulouse III. «Effet de peptides et glycopeptides végétaux sur des lignées cellulaires de kératinocytes HaCaT ».
- Dr Ahu Altinkut Uncuoglu :**
Université de Marmara, Istanbul, Turquie. « Plantes herbacées endémiques du Bosphore : identification de molécules naturelles de défense des plantes (SDP) ».

4-7 Organisation de colloques et conférences

- 12-12-2012 :** Organisation **séminaire**, GRR VASI, Dr Deborah Goffner, "Biologie des ligneux en zone sahélienne en Afrique de l'ouest : contribution des connaissances scientifiques au profit de l'édification de la Grande Muraille Verte en Afrique ».
- 18, 19 et 20-12-2012 :** Organisation et animation **Workshop** « *Labelling of cell wall polysaccharides in plant cell cultures by immunofluorescence microscopy - Cell-wall synthesizing enzymes mapping by TEM immunogold analyses* », programme Interreg IV « *Trans Channel Wallnet* ».
- 15 et 16-06-2010 :** Co-organisation et animation de la **formation** « Techniques de Microscopie Electronique en laboratoire de recherche » destinée aux enseignants Biologie-Géologie de lycées régionaux dans le cadre du plan académique de formation 2010.
- 11- 2003 et 11-2006 :** Co-organisation **Fêtes de la Science**, stand d'accueil et démonstrations « grand public » au sein du village de la Science, Site universitaire du Madrillet.

4-8 Productions scientifiques

4-8-1 Articles publiés dans des revues à comité de lecture (ACL01-16)

- ACL01-Follet-Gueye ML.,** Verdus MC., Demarty M., Thellier M., Ripoll C. (1998) Cambium preactivation in beech correlates with a strong temporary increase of calcium in cambium and phloem but not in xylem cells. *Cell Calcium*. 24 : 205-215. *IF*, 3.766.
- ACL02-Follet-Gueye ML.,** Demarty M., Verdus MC., Ripoll C. (1999) SIMS imaging of Ca and Na, and effect of the ionic interaction Ca/Na on wall maturation of phloem fibres and xylem cells of hypocotyls of beech seedlings. *CR. Acad. Sci.* 322 : 1-9.
- ACL03-Ermel F F, Follet-Gueye ML,** Cibert C, Vian B, Morvan C, Catesson AM and R Goldberg. (2000) Differential localization of arabinan and galactan side chains of rhamnogalacturonan 1 in cambial derivatives. *Planta*. 210 (5) : 732-740. *IF*, 3.00.
- ACL04-Pagny S.,** Bouissonnie F., Sarkar M., **Follet-Gueye ML.,** Driouich A., Schachter H., Faye L. and Gomord V. (2003) Structural requirements for Arabidopsis beta 1,2xylosyltransferase activity and targeting to the Golgi. *Plant J.* 33 : 189-203. *IF*, 6.94.

- ACL05-Follet-Gueye ML.**, Pagny S., Faye L., Gomord V. and Driouich A. (2003) An improved chemical fixation method suitable for immunogold localization of green fluorescent protein in the Golgi apparatus of tobacco Bright Yellow (BY-2) Cells. *J. Histochem. Cytochem.* 51 : 931-940. *IF*, 2.725.
- ACL06**-Saint-Jore-Dupas C., Nebenführ A., Boulaflous A., **Follet-Gueye ML.**, Plasson C., Hawes C., Driouich A., Faye L. and Gomord V. (2006) Plant N-Glycan processing enzymes employ different targeting mechanisms for their spatial arrangement along the secretory pathway. *Plant Cell.* 18 : 3182-3200. *IF*, 9.86.
- ACL07**-Durand C., Vicré-Gibouin M ; **Follet-Gueye ML.**, Duponchel L., Moreau M., Lerouge P. and Driouich A. (2009) The organization pattern of root border-like cells of *Arabidopsis thaliana* is dependent on cell wall homogalacturonan. *Plant Physiol.* 150 : 1411–1421. *IF*, 6.23.
- ACL08**-Chevalier L., Bernard S., Ramdani Y., Lamour R., Bardor M., Lerouge P., **Follet-Gueye ML.** and Driouich A. (2010) Subcompartment localization of the side chain xyloglucan-synthesizing enzymes within Golgi stacks of tobacco suspension-cultured cells. *The Plant J.* 64 : 977-989. *IF*, 6.94.
- ACL09**-Chevalier L., Bernard S., Vicré-Gibouin M., Driouich A., and **Follet-Gueye ML.** (2011) Cryopreparation of tobacco Bright Yellow-2 (BY-2) suspension-cultured cells and application to immunogold localization of Green Fluorescent Protein-tagged-membrane- proteins. *Journal of Biological Research.* 16 : 212-216.
- ACL10**-Percoco G., Benard M., Ramdani Y., Lati E., Lefeuvre L., Driouich A. and **Follet-Gueye ML.** (2012) Isolation of human epidermal layers by laser capture microdissection: application to the analysis of gene expression by quantitative real-time PCR. *Experimental Dermatology.* 21 : 531–534. *IF*, 3.543.
- ACL11**-Driouich A., **Follet-Gueye ML.**, Bernard S., Kousar S., Chevalier L., Vicré-Gibouin M., Lerouxel O. (2012) Golgi-mediated synthesis and secretion of matrix polysaccharides of the primary cell wall of higher plants. *Frontiers in Plant Science.* doi : 10.3389/fpls.2012.00079.
- ACL12**-Cannesan MA., Durand C., Burel C., Gangneux C., Lerouge P., Ishii T., Laval K., **Follet-Gueye ML.**, Driouich A., Vicré-Gibouin M. (2012) Effect of arabinogalactan proteins from the root caps of *Pisum sativum* and *Brassica napus* on *Aphanomyces euteiches* zoospore chemotaxis and germination. *Plant Physiology.* 159(4) : 1658-70. *IF*, 7.054.
- ACL13**-Driouich A., **Follet-Gueye ML.**, Vicré-Gibouin M., Hawes M. (2013) Root border cells and secretions as critical elements in plant host defense *Current Opinion in Plant Biology.* 16 : 489-495. *IF*, 9.2.
- ACL14**-Percoco G., Merle C., Jaouen T., Ramdani Y., Bénard M., Hillion M., Mijouin L., Lati E., Feuilleley M., Lefeuvre L., Driouich A., **Follet-Gueye ML.** (2013) Antimicrobial peptides and pro-inflammatory cytokines are differentially regulated across epidermal layers following bacterial stimuli. *Experimental dermatology.* *In press.*
- ACL15**-Mijouin L.; Hillion M.; Ramdani Y.; Jaouen T.; Duclairoir-Poc C.; **Follet-Gueye ML.**, Lati E.; Yvergnaux F.; Driouich A.; Lefeuvre L.; Farmer C.; Misery L.; G.J. Feuilleley M. (2013) Effects of a Skin Neuropeptide (Substance P) on Cutaneous Microflora. *PLOS ONE.* *In press.*
- ACL16**-Plancot B., Santaella C., Jaber R., **Follet-Gueye ML.**, Leprince J., Souc C., Driouich A., Vicré-Gibouin M. (2013) Deciphering the responses of root border-like cells of *Arabidopsis thaliana* and *Linum usitatissimum* to pathogen-derived elicitors. *Plant Physiology.* *In press.*

4-8-2 Articles soumis dans des revues à comité de lecture (ACL 17)

ACL17-Bernard S., Dardelle F., Lund C.H., Ramdani Y., Loutelier-Bourhis C., Sakuragi Y., Lerouge P., Driouich A., **Follet-Gueye ML**. The Golgi compartmentalization of rhamnogalacturonan I associated epitopes and enzymes potentially involved in arabinan biosynthesis in tobacco BY-2 suspension-cultured cells. *The Plant J*. Soumis le 18 Octobre 2013.

4-8-3 Chapitres d'ouvrages scientifiques (OS01-04)

OS01-Follet-Gueye ML., Ermel FF., Vian B., Catesson AM., Goldberg R. (2000) Pectin remodelling during cambial derivative differentiation, In "*Cell and Molecular Biology of Wood Formation*" edited by RA Savidge, JR Barnett and R Napier BIOS Scientific Publishers, pp 289-293.

OS02-Follet-Gueye ML.(2002) Secondary Ion Mass Spectrometry: Application to the Analysis of Woody Samples. In "*Wood formation in Trees*" ed. N. Chaffey. pp 99-112.

OS03-Driouich A., Cannesan MC., Dardelle F., Durand C., Plancot B., Bernard S., **Follet-Gueye ML.**, Vitré-Gibouin M. (2011) Unity is strength : the power of border cells and border-like cells in relation with plant defense. In *Secretions and Exudates in Biological Systems, Signalling and Communication in Plants*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp 97-107.

OS04-Follet-Gueye ML., Mollet JC., Vitré-Gibouin M., Bernard S., Chevalier L., Plancot B., Dardelle F., Ramdani Y, Coimbra S. and Driouich A. (2012) Immuno-Glyco-Imaging in Plant Cells: Localization of Cell Wall Carbohydrate Epitopes and Their Biosynthesizing Enzymes. In *Applications of Immunocytochemistry*. Ed. Hesam Dehghani ISBN 978-953-51-0229-8. pp 297-320.

4-8-4 Articles dans des revues de vulgarisation scientifique

2011- Follet-Gueye ML. et Driouich A. « Cryomicroscopie : un autre regard sur la vie cellulaire ». Communiqué Focus Recherche *Cosmetic Valley*, n°7, Janv-Févr2011.

2011- Driouich A. et **Follet-Gueye ML.**. A fleur de peau. Rouen Magazine, 2 au 16 mars 2011, n°347, page 9.

2013- Follet-Gueye ML., Percoco G., Bénard M., Vaudry D. and Driouich A. « La microdissection laser de la peau : un nouvel outil d'objectivation dermocosmétique ». Communiqué Focus Recherche *Cosmetic Valley*, in press.

4-8-5 Conférences données sur invitation (INV01-05)

INV01-Follet-Gueye ML., Chevalier L., Driouich A. « Immunolocalisation de la GFP (Green Fluorescent Protein) dans les cellules végétales ». Conférence INRA Nantes, laboratoire Biopolymères Interactions Assemblages, 4 Avril 2013.

INV02-Follet-Gueye ML., Chevalier L., Bernard S., Vitré-Gibouin M., St Jore-Dupas C., Gomord V., Driouich A. "Cryopreparation of plant samples: application to the immunolocalisation of polysaccharidic and proteic samples" Workshop on CryoMicroscopy Electronique. Milan, Italy, September 11-12nd 2007.

INV03-Follet-Gueye ML., Bernard S., Vicré-Gibouin M., Driouich A.. “Immunogold labelling of sugar or protein epitopes within the plant endomembrane system: advantages of cryopreparations.” Cours-Conférences, Master; Université de Porto, Portugal, 11 Novembre 2011.

INV04-Follet-Gueye ML. « Plant Glyco-Imaging ». Mission ERASMUS, Cours-Conférences, Master, Université de Marmara, Istanbul, Turquie, 31 Octobre 2012.

INV05-Follet-Gueye ML., Durand C., Cannesan MA., Plancot B., Jaber R., Nguema-Ona E., Driouich A., Vicré-Gibouin M. “Root border cells and root border-like cells : formation, characterization and function in the rhizosphere”. Cours-conférences, Université Cheickh Anta Diop, Ecole doctorale Sciences de la Vie, de la Santé et de l’Environnement (ED-SEV), Dakar, Sénégal, 17 Avril 2013.

4-8-6 Communications dans des congrès nationaux et internationaux

Communications orales avec actes des congrès nationaux (ACTN01-06)

ACTN01- Follet-Gueye ML., Pagny S., Faye L., Gomord V., Driouich A.. « Immunolocalisation d’une glycosyltransférase golgienne fusionnée à la GFP dans des cellules végétales. » Journées du Réseau Français des Parois, Le Croisic, France, 7-8 Novembre 2003.

ACTN02- Follet-Gueye ML., Pagny S., Faye L., Gomord V., Driouich A. “An improved chemical fixation method suitable for immunogold localization of Green Fluorescent Protein in the Golgi apparatus of tobacco Bright Yellow (BY2) cells”. 5ème Colloque de la Société Française de Physiologie Végétale. Orsay, France, 9-11 Juillet 2003.

ACTN03- Follet-Gueye ML., Bernard S., Chevalier L., Pagny S., Driouich A.. « Cartographie golgienne d’enzymes de synthèse des polysaccharides complexes chez les plantes supérieures ». XXII Journées du Groupe Français des Glucides, Ax-les-Thermes, France, 19-22 mai 2008.

ACTN04- Follet-Gueye ML., Bernard S., Chevalier L., Pagny S., Driouich A. « Cartographie golgienne d’enzymes de synthèse des polysaccharides complexes chez les plantes supérieures ». 14^{ème} Journée IFRMP 23, Evreux, France, 6 Juin 2008.

ACTN05- Percoco G., Merle C., Jaouen T., Lati E., Feuilloley M., Lefeuvre L., Yvergnaux F., Driouich A., **Follet-Gueye ML.** “Effect of two rhamnose-rich polysaccharides on gene expression profile of human skin explants in relation to microbial stimuli”. Cosmetic Ingredients and Biotechnology, Cosming, Saint-Malo, June 26-28 2013.

ACTN06- Nguema-Ona E., Zahid A., His S., Vicré-Gibouin M., Bénard M., **Follet-Gueye ML.**, Driouich A. “A. Screening Natural Actives Isolated from Plant Arabinogalactan Proteins in Cosmetics: the Use of a Novel Enzyme-Based Technology”. Cosmetic Ingredients and Biotechnology, Cosming, Saint-Malo, June 26-28 2013.

Communications orales avec actes dans des congrès internationaux (ACTI01-03)

ACTI01- Chevalier L., St Jore-Dupas C., Bernard S., **Follet-Gueye M.L.**, Gomord V., Driouich A. “Biosynthesis of plant cell walls: compartmentalization analysis of cell wall-synthesizing enzymes within the endomembrane system.” Botanical microscopy meeting. Salzburg, Austria, 31 Mars 2007.

ACTI02- Durand C., **Follet-Gueye ML.**, Cannesan M-A, Plancot B., Dardelle F., Bernard S., Vicré-Gibouin M., Driouich A. “Les cellules bordantes de la racine chez *Arabidopsis thaliana*: formation, caractérisation et rôle dans la santé des plantes ». AFPP- Quatrième conférence

internationale sur les méthodes alternatives en protection des cultures. Lille, 8-10 Mars 2011.

- ACTI03-** Percoco G., Ramdani Y., Bénard M., Merle C., Jaouen T., Lati E., Feuilloley M., Lefeuvre L., Driouich A., **Follet-Gueye ML.** "Human skin explant : a model to study the interaction between epidermal cells and the cutaneous microbiota". 10th Meeting of European Epidermal Barrier Research Network., Venise ,Italy, September 19 2012.

Communications par affiche dans des congrès nationaux ou internationaux (AFF01-23)

- AFF01-** Driouich A., His I., Andème-Onzighi C., **Gueye-Follet ML.**, Lee JY. Making the wall in plant cells. Journée Scientifique de L'IFRMP, Université du Havre, France, 19 mai 2000.
- AFF02-** **Follet-Gueye ML.**, Andème-Onzighi C., His I., Lee JY., Driouich A. Apport de la microscopie à l'étude des parois végétales. Journées du Réseau Français des Parois, INRA de Versailles, France. 11-12 octobre 2000.
- AFF03-** **Follet-Gueye ML.**, Pagny S., Faye L., Gomord V., Driouich A. A novel chemical fixation method of tobacco BY2 cells : application to the study of the endomembrane system. Joint Microscopy Meeting Lille, France, June 24-28 2002.
- AFF04-** Legras M., Karbouche F., **Follet-Gueye ML.**, Giro F., Bert F., Lorens JM., Driouich A. Interdisciplinary study of trace-elements distribution and their uptake by flax plants. 7th International Conference on the Biogeochemistry of Trace. Uppsala, Sweden, June 15-19 2003.
- AFF05-** **Follet-Gueye ML.**, Pagny S., Faye L., Gomord V., Driouich A. An improved chemical fixation method suitable for immunogold localization of Green Fluorescent Protein in the Golgi apparatus of tobacco BY2 cells. Journée de l'IFRMP 23. Université de Rouen, France 6 Juin 2003.
- AFF06-** Gomord V., Pagny S., St Jore-Dupas C., **Follet-Gueye ML.**, Driouich A, Faye L. Golgi protein Characterization and targeting. ISPMB 2003, Barcelona, Spain, June, 23-28 2003.
- AFF07-** Gomord V., St Jore-Dupas C., Pagny S., **Follet-Gueye ML.**, Driouich A., Faye L. Targeting of plant Golgi transferase. EUROCARB 12, Grenoble, France, July 6-12 2003.
- AFF08-** St Jore-Dupas C., Nebenführ A., Boulaflous A., **Follet-Gueye ML.**, Pagny S., Paris N., Driouich A., Faye L., Gomord V. Role of cytosolic tail and transmembrane domain of plant glycosylation enzymes. Keystone symposium "Golgi apparatus and secretory pathway of eukaryotic cells", Breckenridge, Colorado US, January, 20-25 2004.
- AFF09-** Chevalier L., **Follet-Gueye ML.**, Bordat C., Bernard S., Driouich A. High pressure freezing and cryosectioning in plant cells. 9th meeting of the french society of Microscopy. Caen, France, July 4-8 2005.
- AFF10-** St Jore-Dupas C., Nebenführ A., **Follet-Gueye ML.**, Boulaflous A., Hawes C., Driouich A., Faye L., Gomord V. Partitioning of N-glycan maturation enzymes along the secretory pathway and a key role of transmembrane domain length in early-Golgi targeting. Imaging Membrane Dynamics RMS meeting, Egham, UK, Sept 14-17 2006.
- AFF11-** St Jore-Dupas C., Nebenführ A., Boulaflous A., **Follet-Gueye ML.**, Plasson C., Driouich A., Faye L. and Gomord V. Plant N-glycan processing employ different targeting mechanisms for their spatial arrangement along the secretory pathway. FESPB Congress Federation of European Societies of Plant Biology, Lyon, France, July 17-21 2006.
- AFF12-** Bernard S., Chevalier L., St Jore-Dupas C., **Follet-Gueye ML.**, Gomord V., Mouille G., Driouich A. Mapping pectin-synthetizing enzymes within plant Golgi cisternae. Xith Cell Wall meeting. Copenhagen. August 12-17 2007.
- AFF13-** Lamour R., Bernard S., Bardor M., Lerouge P., Driouich A., **Follet-Gueye ML.** Study of Golgi biosynthetic complex involved in xyloglucan galactosylation. 15ième Journée IFRMP 23, Rouen, 5 Juin 2009.

- AFF14-** Bernard S., Chevalier L., **Follet-Gueye ML.**, Harholt J., Sakuragi Y., Scheller HV., Driouich A. Golgi-mediated biosynthesis of pectins: localization and complex formation of rhamnogalacturonan-I-synthesizing enzymes. 15 ième Journée IFRMP 23, Rouen, 5 Juin 2009.
- AFF15-** Bernard S., Ramdani Y., Percoco G., Viché M., Driouich A. and **Follet-Gueye ML.** Specimen Preparation for Transmission Electron Microscopy : Advantages and perspectives of Cryomethods. Cosm'ing 2010, St Malo, France.
- AFF16-** Percoco G., Ramdani Y., Bernard S, Bénard M., Lati E., Lefeuvre L., Driouich A. and **Follet-Gueye ML.** Ultrastructural characterization and transcriptional analysis of human skin. 2nd Skin Physiology International Meeting (SPIM), Vichy, France, 17-19 Novembre 2010.
- AFF17-** Durand C., **Follet-Gueye ML.**, Cannesan M-A, Plancot B., Dardelle F., Bernard S., Viché-Gibouin M. and A. Driouich. Les cellules bordantes de la racine chez Arabidopsis thaliana: formation, caractérisation et rôle dans la santé des plantes. AFPP- Quatrième conférence internationale sur les méthodes alternatives en protection des cultures. Lille, 8-10 Mars 2011.
- AFF18-** Percoco G., Ramdani Y., Bernard S., Bénard M., Lati E., Lefeuvre L., Driouich A. and **Follet-Gueye ML.** Gene expression profile across the human epidermal layers : a laser capture microdissection study. Université de Caen, Journée EdNbise, 6 Juin 2011.
- AFF19-** Percoco G., Ramdani Y., Bénard M., Bernard S., Lati E. , Lefeuvre L. ,Driouich A. and **Follet-Gueye ML.** Defensive genes expression profile across the human epidermal layers: a laser capture microdissection study. 41st Annual European Society for Dermatological Research (ESDR) meeting. Barcelone du 7 au 10 septembre 2011.
- AFF20-** Plancot B., Jaber R., Santaella C., Gotte M., Leprince J., **Follet-Gueye ML.**, Driouich A. Viché-Gibouin M. Involvement of root border-like cells in plant defense. 14 ième journée de l'Ecole doctorale Normandie Biologie Intégrative, Santé, Environnement au Havre. 8 et 9 Juin (2011) (Prix du meilleur poster).
- AFF21-** Percoco G., Merle C., Jaouen T., Ramdani Y., Bénard M., Lati E., Feuilloley M., Lefeuvre L., Driouich A. and **Follet-Gueye ML.** Human skin explants: a model to study the interaction between epidermal cells and the cutaneous microbiota. 41st Annual European Society for Dermatological Research (ESDR) meeting. Venise 19-22 septembre 2012.
- AFF22-** Merle C., Peno-Mazzarino L., Percoco G., Ramdani Y., **Follet-Gueye ML.**, Lati E. and Driouich A. Transcriptomal to morphological modification induced by bacteria on human skin explants. 27ème International Federation of Societies of Cosmetic Chemists (IFSCC) meeting. Johannesburg, South Africa 15-18 October 2012.
- AFF23-** Hillion M., Percoco G., Mijouin L., Jaouen T., **Follet-Gueye ML.**, Lati E., Driouich A., Feuilloley M., Lefeuvre L. Impact of Uriage thermal water on the physiology of skin bacteria. 3rd Cosmetic Innovation Day, Cosminnov, Orléans, 8-9 October 2013.

5 – Travaux de recherche

5-1 Doctorat et post-doctorat – Universités de Rouen et Paris 7 (1994-1999)

Durant mes travaux de recherche doctorale et post-doctorale, respectivement réalisés dans les laboratoires « Processus Ioniques et Cellulaires » (UPRES A CNRS 6037) de l'Université de Rouen et « Enzymologie en Milieux structurés » (Institut Jacques Monod) de l'Université Paris 7, je me suis intéressée à la **cytophysiologie cambiale**. Le cambium ou assise génératrice libéro-ligneuse est un tissu méristématique secondaire, qui chez les espèces ligneuses, présente une activité cyclique contrôlée par l'alternance des saisons dans les régions tempérées. Ce territoire cellulaire joue un rôle majeur dans la croissance secondaire des arbres. Il constitue un modèle intéressant pour étudier les processus de croissance et de différenciation cellulaire chez les végétaux supérieurs.

Au cours de ma thèse, j'ai exploré l'implication des éléments minéraux majeurs (Na^+ , Mg^{2+} , K^+ et Ca^{2+}) dans la réactivation cambiale et la xylogénèse chez le hêtre, *Fagus sylvatica* L. par une approche d'Imagerie Ionique Analytique (MIA ou *Secondary Ion Mass Spectrometry*, SIMS). L'application de la MIA aux échantillons ligneux a nécessité des mises au point méthodologiques notamment en terme de préparations des échantillons (Follet-Gueye, 2002-**OS02**). Ces travaux de thèse ont montré que la réactivation cambiale chez le hêtre s'accompagne d'une hausse transitoire des teneurs calciques dans les cellules phloémiennes et dans les initiales cambiales (Follet-Gueye *et al.*, 1998-**ACL01**). Ce phénomène semble lié à la réactivation basipète du cambium chez ce type d'arbre.

Mes activités post-doctorales ont été centrées sur la recherche de marqueurs pariétaux de la différenciation des dérivées cambiales chez une variété hybride de tremble, *Populus tremula* L. \times *P. tremuloides* Michx. Des approches immunocytochimiques et biochimiques ont permis de montrer que les parois cellulaires des dérivées cambiales phloémiennes et xylémiennes diffèrent très précocement (Ermel *et al.*, 2000-**ACL03**). L'immuno-détection d'épitopes associés aux chaînes arabinanes et galactanes des composés pectiques pariétaux de type rhamnogalacturonane 1 (**Figure 7**) a été conduite par microscopie optique à épifluorescence et par microscopie électronique à transmission. Les ramifications arabinanes sont essentiellement détectées dans les tissus corticaux et dans la zone cambiale, alors que les chaînes de galactanes sont exclusivement localisées dans les dérivées cambiales xylémiennes et les cellules ligneuses en cours de différenciation. Ces données ont été confirmées par des analyses biochimiques des parois cellulaires après isolement des tissus par cryomicrotomie.

L'ensemble de ces travaux de recherche a donné lieu à :

3 publications dans des revues à comité de lecture :

ACL01- Follet-Gueye *et al.* (1998) *Cell Calcium*. 24 : 205-215.

ACL02- Follet-Gueye *et al.* (1999) *CR Acad. Sci.* 322 : 1-9.

ACL03- Ermel *et al.* (2001) *Planta*. 210 : 732-740.

2 chapitres de livre :

OS01- Follet-Gueye *et al.* (2000) Pectin remodelling during cambial derivative differentiation, In "Cell and Molecular Biology of Wood Formation" edited by RA Savidge, JR Barnett and R Napier BIOS Scientific Publishers, pp 289-293.

OS02- Follet-Gueye (2002) Secondary Ion Mass Spectrometry : Application to the Analysis of Woody Samples. In « *Wood formation in Trees* » ed. N. Chaffey, pp 99-112.

5-2 Enseignant-chercheur – Université de Rouen (2000-2013)

Les travaux de recherche menés au sein du laboratoire GlycoMEV s'organisent autour de trois axes thématiques généraux. Le premier axe historique du laboratoire s'intéresse à **l'extraction, la caractérisation, et l'étude des mécanismes de biosynthèse des glycomolécules végétales (Axe 1)** : glycoprotéines, protéoglycanes et polysaccharides non cellulosiques. En lien avec cet aspect fondamental, deux autres axes appliqués sont menés. **Un axe agronomique** qui vise à évaluer le rôle et l'impact des glycomolécules végétales dans **l'immunité** et la **santé des plantes (Axe 2)**. Enfin, la valorisation des connaissances des processus de glycosylation de systèmes végétaux modèles en **thérapie humaine**, et l'exploration des potentialités de glycomolécules végétales dans le **secteur dermocosmétique** constituent le second volet appliqué de nos recherches (**Axe 3**).

L'ensemble de mes activités de recherche se répartit dans ces 3 axes (**tableau 2**). Dans ce manuscrit les éléments suivants seront décrits :

- Axe 1** : organisation fonctionnelle de l'appareil de Golgi des plantes supérieures en lien avec la biosynthèse des polysaccharides pariétaux ;
- Axe 2** : implication des cellules apparentées aux cellules bordantes ou BLCs dans les interactions plante(s)-pathogène(s) ;
- Axe 3** : glycomolécules végétales et immunité cutanée en lien avec l'écologie microbienne de la peau.

Tableau 2 : Encadrements d'étudiants de master recherche et de doctorat associés aux travaux de recherche décrits dans ce manuscrit. Dr ML. Follet-Gueye

Axe 1	Développement de cryométhodes en MET : application à l'étude de l'appareil de Golgi dans la synthèse de polysaccharides matriciels chez les plantes supérieures	Doctorat , L. Chevalier 09-2004/ 06-2008 <i>IE Service ME, PRIMACEN</i>	Pr A. Driouich (50%) Dr ML. Follet-Gueye (50%)
	Synthèse des polysaccharides pariétaux : mise en évidence de complexes multi-enzymatiques golgiens	Master 2 , R. Lamour 09-2008/07-2009	Pr A. Driouich (50%) Dr ML. Follet-Gueye (50%)
	Existence de complexes enzymatiques golgiens de synthèse des chaînes pectiques, RGI	Doctorat , S. Bernard Soutenance prévue le 03-12-2013 <i>IE Service ME, PRIMACEN</i>	Pr A. Driouich (50%) Dr ML. Follet-Gueye (50%)
Axe 2	Implication des cellules apparentées aux cellules bordantes dans la défense racinaire : étude du pathosystème <i>Linum usitatissimum – Fusarium oxysporum</i>	Master 2 , R. Jaber 09-2011/07-2012	Dr M. Vitré-Gibouin (50%) Dr ML. Follet-Gueye (50%)
	Sélection de nouvelles substances naturelles de défense des plantes (SDP) et caractérisation des réponses moléculaires	Doctorat , R. Jaber En cours <i>GRR VASI</i>	Pr JC. Mollet (50%) Dr ML. Follet-Gueye (50%)
Axe 3	Biomolécules et Immunité cutanée en lien avec l'écologie microbienne de la peau	Doctorat , G. Percoco 12-2009 / 12-2012 <i>FUI, Cosmetic Valley</i>	Pr A. Driouich (50%) Dr ML. Follet-Gueye (50%)

5-2-1 Organisation fonctionnelle de l'appareil de Golgi des plantes supérieures en lien avec la biosynthèse des polysaccharides pariétaux

Ce travail a été initié en 2000 lors de mon arrivée dans le laboratoire « Glycobiologie et transport chez les végétaux UMR 6037 ». Dans le cadre d'une étude transversale entre deux équipes du laboratoire, les équipes « Polysaccharides et AGPs » et « Glycobiologie et adressage », respectivement dirigées par le Pr A. Driouich et le Dr V. Gomord, j'ai tout d'abord travaillé à la localisation d'enzymes golgiennes de maturation des N-glycanes chez la plante modèle *Nicotiana tabacum*. De janvier à juin 2005, je bénéficie d'une CRCT et centre mes travaux sur un axe de recherche de l'équipe « Polysaccharides et AGPs » s'intéressant aux enzymes golgiennes impliquées dans la biosynthèse des polysaccharides pariétaux. Le développement des méthodologies de cryomicroscopie électronique lors de la thèse de L. Chevalier conduira à l'établissement de la cartographie golgienne de trois enzymes impliquées dans la synthèse d'un composé hémicellulosique, le xyloglucane. De janvier 2008 à décembre 2011, successivement au sein de la FRE 3090 puis du laboratoire GlycoMEV, je porte le projet visant à définir l'organisation en complexes golgiens des enzymes de biosynthèse des polysaccharides non celluloses chez les végétaux.

5-2-1-1 Appareil de Golgi des végétaux supérieurs : structure et dynamique

L'appareil de Golgi est présent chez la majorité des organismes eucaryotes mono- ou pluricellulaires où il occupe une position centrale dans le système endomembranaire de sécrétion (Staehelin et Moore, 1995 ; Jürgens, 2004 ; Képès *et al.*, 2005). Depuis sa découverte en 1898 par Camillo Golgi, les développements méthodologiques de la microscopie électronique ou photonique, de la biochimie et de la génétique ont mis en lumière l'organisation architecturale et fonctionnelle de l'appareil de Golgi ainsi que sa dynamique chez les mammifères, les plantes supérieures et les levures. Cet organite est impliqué dans la modification post-traductionnelle des protéines (glycoprotéines et protéoglycanes), ainsi que dans leur transport vers d'autres unités du système endomembranaire (lysosomes-vacuoles) ou vers la surface cellulaire. Chez les végétaux, le complexe golgien est de plus, le site de synthèse, d'assemblage et de tri des polysaccharides complexes non celluloses de la matrice extracellulaire et des N/O-glycoprotéines (Driouich *et al.*, 1993 ; Nebenführ et Staehelin, 2001).

Alors que dans les cellules animales, l'appareil de Golgi est, le plus souvent, organisé en un nombre limité d'unités périnucléaires, le complexe golgien des cellules végétales est fragmenté en de multiples unités (ou empilements golgiens) dispersées dans le cytoplasme, dont le nombre et la morphologie varient en fonction des espèces végétales ou du type cellulaire (Zhang et Staehelin, 1992 ; Driouich et Staehelin, 1997).

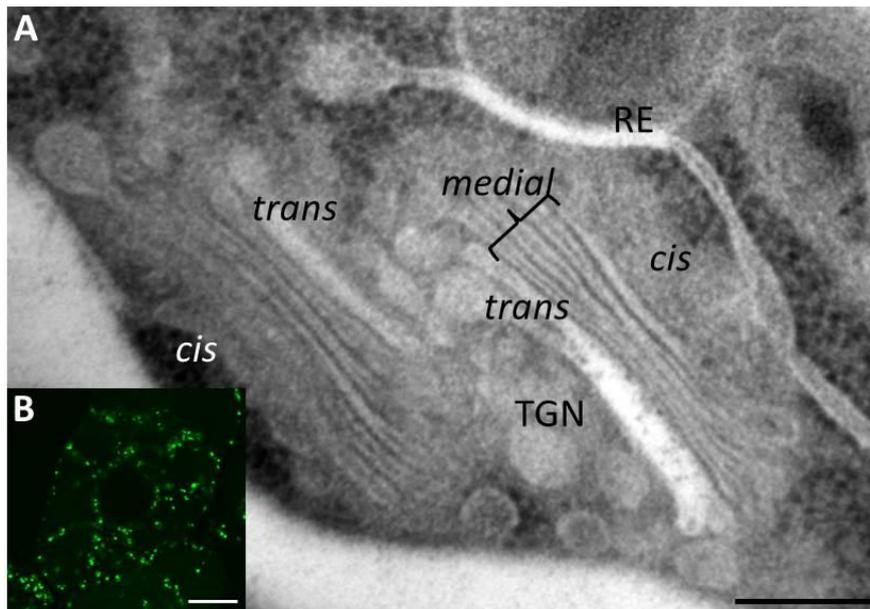


Figure 3 : Morphologie des unités golgiennes de cellules végétales.

(A), Micrographie électronique de deux empilements golgiens et de leur réseau trans golgien (*Trans Golgi Network*, TGN) de cellules de tabac (*Bright yellow-2 cells, Nicotiana tabacum*) cryofixées à haute pression et déshydratées à froid. (B), Imagerie confocale des unités golgiennes dans une cellule de tabac exprimant une enzyme golgienne de synthèse du xyloglucane (AtMUR3-GFP). (Driouich *et al.*, 2012-ACL11).

At, *Arabidopsis thaliana* ; MUR3, MURUS3 ; RE, réticulum endoplasmique ; barre d'échelle : 100 nm (A) et 8µm (B).

Des études ultrastructurales en cryomicroscopie électronique sur l'appareil de Golgi de plusieurs espèces végétales ont mis en évidence que chaque empilement golgien est constitué de trois compartiments distincts appelés : *cis*, *median* et *trans* (Staehelin *et al.*, 1990). Cette compartimentation des unités golgiennes est basée sur les aspects morphologiques des saccules : dimensions et propriétés de contraste. Ces unités présentent 3 à 10 empilements de citernes sont d'une taille comprise entre 0.5 et 2.0 µm. Ainsi, lors des travaux de thèse de L. Chevalier, les unités golgiennes de cellules de tabac (*Bright yellow-2 cells, Nicotiana tabacum*), cellules congelées sous haute pression et cryodéshydratées par substitution dans de l'acétone contenant 0.5 % d'acétate d'uranyle puis enrobées à froid dans une résine acrylique type *London Resin White*, montrent cette polarité caractéristique (Figure 3A). Souvent situées à proximité du réticulum endoplasmique (RE), les citernes *cis* possèdent des contours irréguliers et une large lumière faiblement contrastée. Le compartiment *median* comprend des saccules plus étendues à lumen aminci mais plus contrasté comparé aux saccules *cis*. Les saccules du *trans* Golgi se reconnaissent à leur lumen fin beaucoup plus contrasté que dans le compartiment *median*. Le réseau trans golgien (*Trans Golgi Network*, TGN) est un système tubulovésiculaire, de plus en plus considéré comme un compartiment post-golgien (Dettmer *et al.*, 2006; Richter *et al.*, 2009; Viotti *et al.*, 2010), pouvant être associé aux empilements du *trans* Golgi. L'exploration de la dynamique du complexe golgien des plantes supérieures s'est considérablement développée depuis une dizaine d'années suite à l'essor de la biologie moléculaire couplée à la découverte de sondes fluorescentes de type *Green Fluorescent Protein* (GFP) et ses nombreux variants (Sparkes et Brandizzi, 2012). Après marquage spécifique des unités golgiennes dans des cellules de tabac (*Bright yellow-2 cells, Nicotiana tabacum*) exprimant une enzyme golgienne d'*Arabidopsis* fusionnée à la GFP (MUR3-GFP), ces unités arborent une forme caractéristique ponctiforme (Figure 3B; Thèse L. Chevalier). La mobilité des complexes golgiens de plante a fait l'objet de nombreuses études réalisées par microscopie optique confocale à balayage laser, utilisant des sondes fluorescentes de visualisation du système endomembranaire (RE et Golgi). Les unités golgiennes, étroitement associées au RE, se déplacent à la surface de la zone d'exportation du RE en empruntant les filaments d'actine et de myosine (Boevink *et al.*, 1998; Nebenführ *et al.*, 1999 ; Sparkes *et al.*, 2009). Deux hypothèses se sont longtemps opposées pour décrire la

progression du matériel synthétisé au sein des saccules golgiennes : le modèle du transport vésiculaire où les saccules golgiennes sont statiques (Staehelein et Moore, 1995 ; Nebenführ et Staehelein, 2001 ; Nebenführ, 2003) et le modèle impliquant la progression-maturation des citernes (Hawes *et al.*, 1996). Dans ce dernier modèle, qui semble maintenant faire consensus, le matériel destiné à la sécrétion ne quitte jamais sa saccule d'origine. De nouvelles citernes sont formées en continu à partir des vésicules du compartiment *cis*. L'ajout des nouvelles citernes à la face *cis* du complexe golgien engendre le déplacement des autres saccules vers la face *trans* (Figure 4A). Des études dynamiques et des analyses tomographiques par immuno-microscopie électronique ont permis de caractériser plusieurs types de vésicules responsables du trafic entre le RE et les unités golgiennes. Les vésicules arborant les protéines de revêtement COPII sont impliquées dans le transport antérograde, du RE vers le compartiment *cis* golgien, alors que les vésicules COPIa et COPIb sont impliquées dans le recyclage des membranes golgiennes (ou transport rétrograde) (Kang et Staehelein, 2008 ; Nakano and Luini, 2010). Une matrice golgienne dépourvue de ribosomes, initialement découverte par des analyses morphologiques de MET (Staehelein et Moore, 1995 ; Driouich et Staehelein, 1997), englobe chaque empilement golgien assurant stabilité et maintien de la polarité (Figure 4B). Les éléments moléculaires de cette matrice sont constitués de diverses protéines d'ancrage parmi lesquelles des golgines ont été récemment décrites (Osterrieder, 2012).

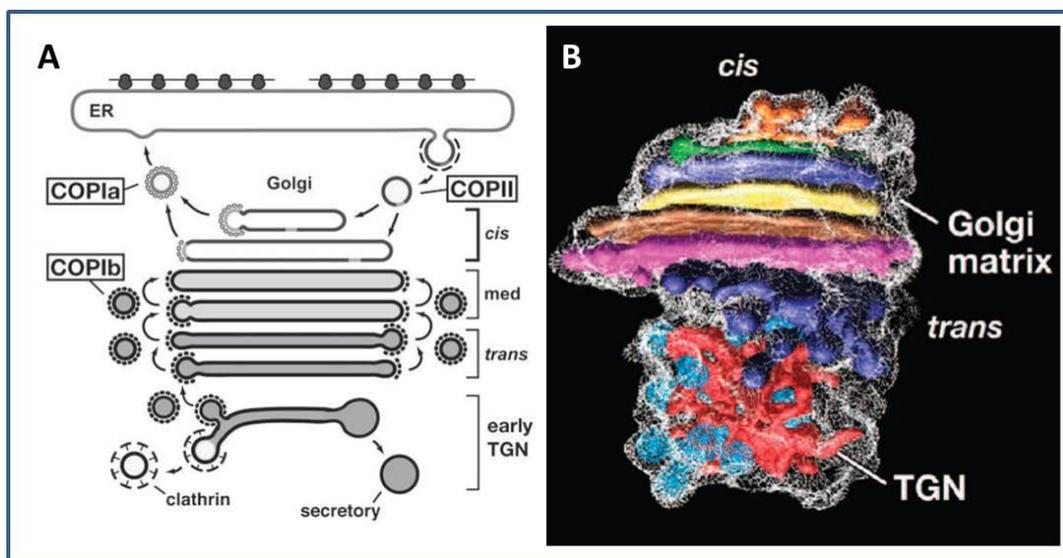


Figure 4 : Représentation schématique d'un empilement golgien illustrant le modèle de progression-maturation des citernes golgiennes et le trafic vésiculaire associé entre le RE, les unités golgiennes et le TGN. Kang et Staehelein, 2008.

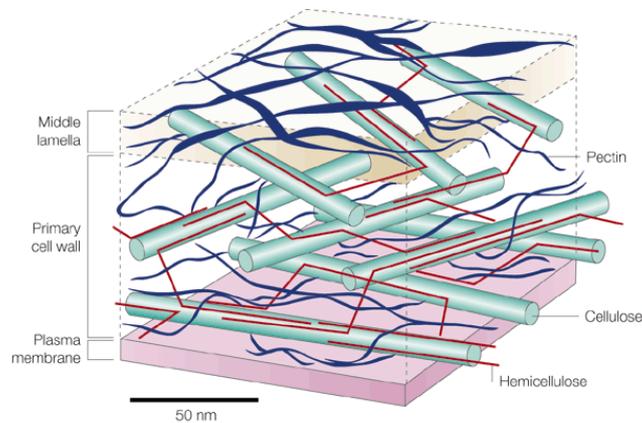
(A), Les zones d'export du RE forment les vésicules COPII qui fusionnent et sont à l'origine des citernes *cis*. Au niveau des citernes du compartiment *cis*, le bourgeonnement des vésicules COPIa assure le recyclage rétrograde vers le RE. Les citernes *median*, *trans* et le TGN précoce produisent les vésicules COPIb permettant ainsi le recyclage moléculaire de ces compartiments golgiens. (B), Reconstruction tomographique d'une unité golgienne montrant la matrice golgienne dépourvue de ribosomes.

ER, *endoplasmique reticulum*; TGN, *Trans Golgi Network*.

5-2-1-2 Composition et organisation de la paroi primaire végétale

Les cellules végétales sont caractérisées par la présence d'une matrice extracellulaire complexe et dynamique appelée aussi paroi (**Figure 5**). Une paroi primaire entoure tous les types cellulaires végétaux, tandis que seules certaines cellules spécialisées présentent des épaisissements secondaires de cellulose et de lignine (fibres, vaisseaux de xylème, cellules formant les tissus de soutien). Dans ce manuscrit, la paroi primaire de type I, caractéristique des plantes angiospermes monocotylédones, à l'exception des *Commelinoides* (Carpita et McCann, 2000) et des plantes angiospermes eu-dicotylédones, sera décrite.

La paroi primaire joue un rôle fondamental dans la croissance et le développement des plantes, assure des fonctions vitales telles le contrôle de la différenciation et la morphogénèse cellulaires ou encore la défense vis-à-vis de stress biotiques (Vicré *et al.*, 2005) ou abiotiques (Moore *et al.*, 2006). La paroi des cellules végétales est constituée principalement de polysaccharides (cellulose, hémicelluloses et pectines : **Figure 5**), et de glycoprotéines et protéoglycanes (arabinogalactanes protéines, extensines...).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figure 5 : Organisation de la paroi primaire des plantes eu-dicotylédones. **Smith, 2001.**

La cellulose est organisée en microfibrilles comprenant chacune 36 chaînes de résidus β -(1,4)-D-glucose, constituant ainsi l'ossature pariétale. Le composé hémicellulosique le plus abondant dans les parois primaires de type I est le xyloglucane (XyG) (Scheller et Ulvskov, 2010). Il est constitué d'un squelette de β -(1,4) glucanes portant des résidus xylose, eux-mêmes substitués par des résidus galactose et fucose (**Figure 6**). Par ces interactions avec les microfibrilles de cellulose, le XyG joue un rôle essentiel dans le contrôle de la croissance et le développement des végétaux (Cosgrove, 2000).

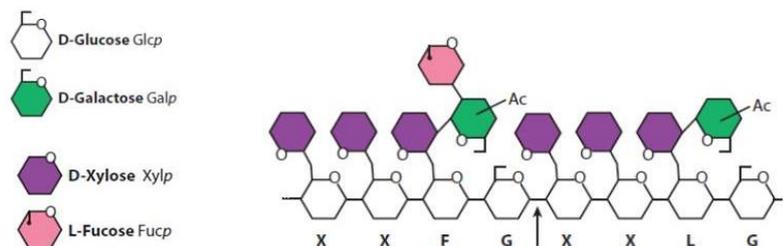


Figure 6 : Structure du squelette de xyloglucane substitué par les chaînes latérales retrouvées chez les plantes *A. thaliana* et *P. sativum*. **Scheller et Ulvskov, 2010.**

5-2-1-3 Rôle de l'appareil de Golgi dans la synthèse des polysaccharides non celluloses

Contrairement aux microfibrilles de cellulose, synthétisées par le complexe enzymatique « cellulose synthase » de la membrane plasmique, les polysaccharides non celluloses (aussi nommés polysaccharides complexes), ainsi que les protéines pariétales, sont synthétisés et assemblés au sein des empilements golgiens puis transportés jusqu'à la paroi (**Figure 8**).

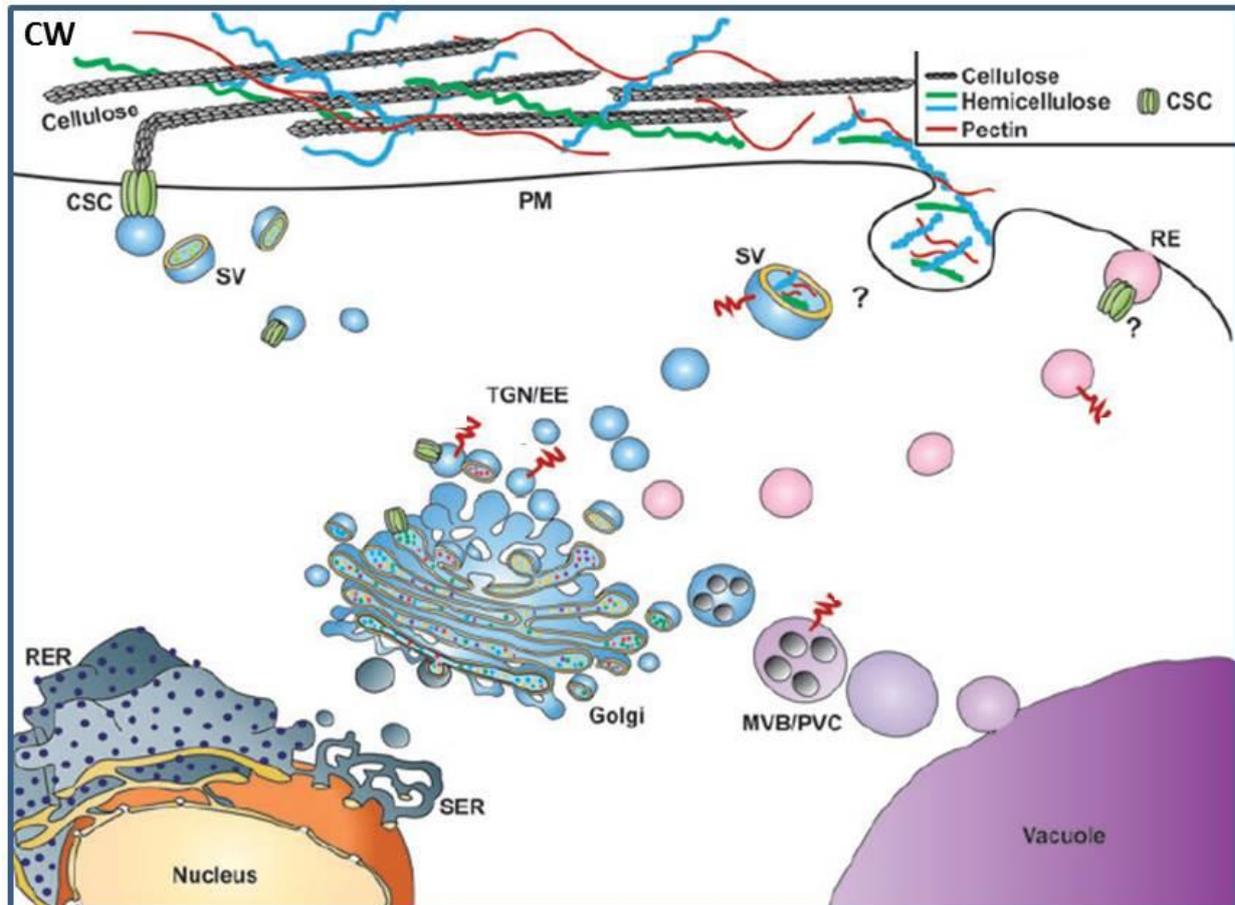


Figure 8 : Synthèse et sécrétion des polysaccharides complexes végétaux. Worden *et al.*, 2012.

CSC, cellulose synthase complex ; CW, cell wall ; MVB/PVC, multivesicular body/prevacuolar compartment ; PM, plasma membrane ; RE, recycling endosome ; RER, ruguous endoplasmic reticulum ; SER, smooth endoplasmic reticulum ; SV, secretory vesicle ; TGN/EE, Trans Golgi network /Early endosome.

La biosynthèse des polysaccharides complexes implique l'action concertée des enzymes d'interconversion des sucres (épimérasés, déshydrolyses, décarboxylases et mutases) (Seifert, 2004 ; Reiter, 2008), de leurs transporteurs (Handforg *et al.*, 2004) et de glycosyltransférasés (GTs) golgiennes (**Figure 9A**). Alors que la cartographie golgienne de polysaccharides complexes a été initiée par des approches d'immunocytochimie et de microscopie électronique (Zhang et Staehelin, 1992 ; Andème-Onzighi *et al.*, 2000), peu d'études ont été consacrées à la localisation des enzymes impliquées dans leur processus de biosynthèse. Le clonage de gènes codant pour certaines de ces enzymes montre qu'outre les GTs, des épimérasés (Burget *et al.*, 2003) et des décarboxylases (Pattathil *et al.*, 2005) seraient des protéines transmembranaires de type II et pourraient ainsi être associées à l'appareil de Golgi. De plus, d'autres enzymes d'interconversion des sucres, impliquées dans la synthèse du XyG (Barber *et al.*, 2006) et des chaînes pectiques RGI (Duggha *et al.*, 1997 ; Drakakaki *et al.*, 2006), bien que cytoplasmiques ont été localisées par immuno-microscopie électronique à proximité des membranes des saccules golgiennes. Une hypothèse a donc émergé

d'une possible co-localisation au sein de l'appareil de Golgi d'enzymes d'interconversion et des GTs, pour former des complexes enzymatiques de biosynthèse des polysaccharides non celluloseux (Seifert, 2004) (**Figure 9B**).

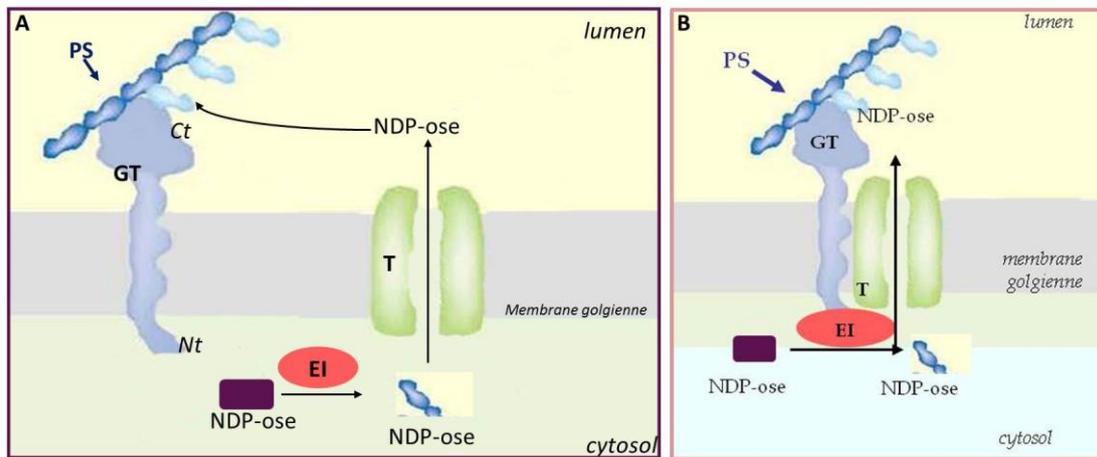


Figure 9 : Etapes de biosynthèse des polysaccharides complexes au sein des empilements golgiens.

- (A) Après activation des oses par addition d'un groupement nucléotide di-phosphate (NDP), les nucléotides oses (NDP-osés) peuvent être convertis par les enzymes d'interconversion (EI) et être pris en charge par un transporteur (T) spécifique qui assure leur transit du cytoplasme vers le lumen de la citerne golgienne. Les glycosyltransférases (GTs), enzymes transmembranaires de type II (à site catalytique en position C terminale (Ct) et intraluminal) transfèrent alors l'ose sur la chaîne de polysaccharides (PS) en cours d'élongation.
- (B) Certaines EI peuvent elles-mêmes être des enzymes transmembranaires de type II ou bien être situées à proximité des membranes golgiennes. Ceci postule alors l'existence de complexe enzymatique golgien de synthèse des PS. Nt, N terminal.

Les objectifs de ce travail ont été :

-De réaliser la compartimentation golgienne d'enzymes de synthèse du XyG, des chaînes pectiques HG et RGI.

-D'étudier l'existence de complexes enzymatiques golgiens de synthèse des polysaccharides non celluloseux.

5-2-1-4 Cartographie golgienne d'enzymes de synthèse du XyG, et des chaînes pectiques HG et RGI

La localisation des enzymes golgiennes (**tableau 4**) potentiellement impliquées dans la synthèse du XyG, des chaînes pectiques HG et RGI a été réalisée par une approche immunocytoologique indirecte couplée à la microscopie électronique à transmission, *via* l'utilisation d'anticorps commerciaux dirigés contre la *Green Fluorescent Protein* (GFP) préalablement fusionnée aux enzymes d'intérêt (**Figure 10A**). Cette approche permet d'étudier des protéines pour lesquelles aucun anticorps spécifique n'est disponible. Les différentes constructions ont été exprimées de façon transitoire puis stable chez des plantules et des suspensions cellulaires de *Nicotiana tabacum* respectivement. Concernant l'enzyme QUA2 (QUASIMODO2)-GFP (**tableau 4**) elle est exprimée dans des plantules mutantes d'*Arabidopsis* (mutant *qua2*) complémentées par la construction QUA2-GFP (Mouille *et al.*, 2007).

Dans un premier temps, la localisation golgienne de chaque protéine chimère a été vérifiée *in vivo* par microscopie confocale à balayage laser (**Figure 10B**). Secondairement, nous avons procédé à la localisation à l'échelle ultrastructurale des protéines chimères dans les suspensions cellulaires de tabac transformées (**Figure 10C**) et les apex racinaires d'*Arabidopsis*. Ce travail a dû répondre à une double exigence visant non seulement à conserver les ultrastructures cellulaires au plus proche de leur état natif, mais également à préserver l'épitope protéique recherché. Pour répondre à ce double

objectif, nous avons mis en œuvre l'une des approches les plus performantes, la cryofixation sous haute pression (*High Pressure Freezing*, HPF), couplée à la cryodéshydratation (*Freeze Substitution*, FS) des échantillons. Le service MET de la plateforme d'imagerie PRIMACEN étant alors équipé du premier système de congélation commercialisé par la société Leica (EMPact1), nous avons optimisé son usage pour la préparation d'échantillons végétaux hautement hydratés tels que les suspensions cellulaires de tabac. Ces aspects méthodologiques ont été accomplis durant la thèse de L. Chevalier et publiés en 2011 (Chevalier *et al.*, 2011-**ACL09**). De plus, nous avons réalisé une analyse quantitative des immunolocalisations de certaines protéines chimères basée sur une approche statistique développée par Mayhew *et al.* (2002, 2011), approche consistant à déterminer l'index relatif de marquage (ou *Relative labeling Index*, RLI) (Follet-Gueye *et al.*, 2012-**OS04**).

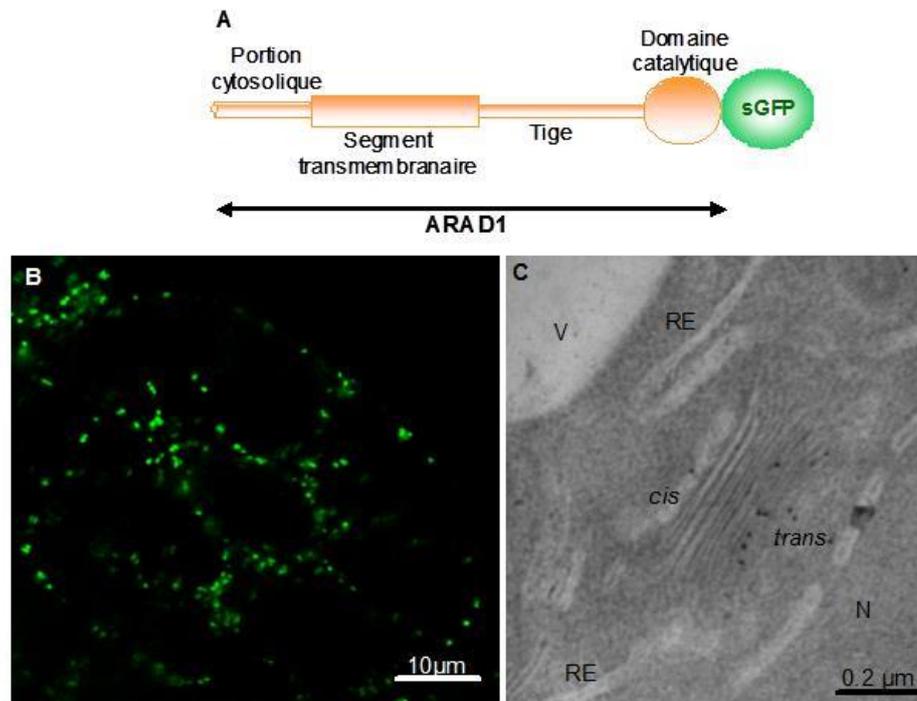


Figure 10: Localisation golgienne de l'α(1,5)-arabinosyltransférase, ARAD1. Bernard *et al.*, soumis-ACL17**.**

(A) : Schéma de la protéine de fusion ARAD1-GFP exprimée dans des suspensions cellulaires de tabac. (B) : Localisation subcellulaire de ARAD1-GFP par microscopie confocale à balayage laser. (C) : Immunodétection de la protéine ARAD1-GFP *via* des anticorps anti-GFP dans des cellules de tabac fixées par congélation haute pression. N : noyau, RE : réticulum endoplasmique, V : vacuole.

Cette analyse nous a permis de cartographier très précisément trois glycosyltransférases impliquées dans la synthèse des chaînes latérales du XyG (AtXT1-GFP, AtMUR3-GFP et AtFUT1-GFP ; Chevalier *et al.*, 2010-**ACL08**). Cette approche statistique a également été appliquée lors de la thèse de Sophie Bernard à la cartographie d'une glycosyltransférase (AtARAD1, *arabinan deficient 1*, une arabinosyltransférase potentielle) et deux UDP-xylose-4-épipimérases (MUR4, murus4/UXE1 et UXE3), enzymes susceptibles d'intervenir dans la synthèse des chaînes pectiques RGI. Durant les travaux de thèse de S. Bernard, nous avons également cartographié par immunocytochimie électronique des épitopes associés aux chaînes pectiques RGI.

Les résultats obtenus sont présentés dans les **tableaux 3 et 4** ci-après. Comme précédemment décrit chez d'autres systèmes végétaux, pour les épitopes associés aux polysaccharides pectiques (Zhang et Staehelin, 1992 ; Vicié *et al.*, 1998) ou au XyG (Zhang et Staehelin, 1992 ; Driouich *et al.*, 1994), le marquage d'épitopes associés aux polysaccharides complexes (XyG, HG et RGI) concerne essentiellement les compartiments tardifs des unités golgiennes (*trans*) ainsi que les vésicules du TGN (**tableau 3**). Seule la détection par les anticorps INRA-RUI (Ralet *et al.*, 2010) du squelette des chaînes pectiques RGI est observée dans le compartiment *median*, localisation similaire à celle

obtenue par Zhang et Staehelin (1992) dans des suspensions cellulaires de sycamore avec la sonde immunologique anti-PGA/RGI (anti-polygalacturonic acid/Rhamnogalacturonan I).

Tableau 3 : Localisation d'épitopes associés aux polysaccharides (PS) complexes.

A l'exception de la sonde anticorps JIM7, utilisée sur des apex racinaires d'*Arabidopsis*, les autres sondes immunologiques ont été testées sur des suspensions sauvages de suspensions cellulaires de tabac (BY-2).

(*) : immunogold quantifié en appliquant le test de Mayhew (2002, 2011).

Anticorps	Epitope reconnu	PS	Références	Localisation
CCRCM86	non identifié	XyG non fucosylé	Pattathil <i>et al.</i> (2010)	<i>median, trans, TGN</i>
JIM7	GalA-(1,4)-[(MeGalA)]4-(1,4)-GalA	HG méthylestérifié	Clausen <i>et al.</i> (2003)	<i>trans, TGN</i>
INRA-RU1	[→2)--L-rhamnose p-(1→4)--D-galacturonic acid p-(1→)6/7	Chaîne principale RGI	Ralet <i>et al.</i> (2010)	<i>median*</i>
LM13	[α(1-5) <i>unbranched arabinan</i>]5/11	Chaînes laterales RGI	Verhertbruggen <i>et al.</i> (2009)	<i>trans*</i>
LM6	[α(1-5) <i>highly branched arabinan</i>]5/6	Chaînes laterales RGI	Willats <i>et al.</i> (1998)	TGN*
LM5	[β(1-4) galactan]>3	Chaînes laterales RGI	Jones <i>et al.</i> (1997)	TGN*
LM16	<i>Galactosyl residue/galactan stub between arabinan chain and RGI backbone</i>		Verhertbruggen <i>et al.</i> (2009)	TGN*

La détection des protéines de fusion de type glycosyltransférase-GFP au sein des différentes citernes golgiennes (*cis-median-trans-TGN*) suppose que tous les compartiments de l'appareil de Golgi sont impliqués dans la biosynthèse des polymères non cellulotiques de la paroi (**tableau 4**). Cette hypothèse apparait contradictoire avec le concept récemment décrit par Donohoe *et al.*, (2013) qui propose que les compartiments *median* et *trans* seraient les sites d'assemblage et de synthèse des polysaccharides et de maturation des glycanes, alors que le compartiment *cis* serait totalement inactif dans ces deux processus. Il est à noter cependant que la présence de la protéine chimère AtXT1-GFP (xylosyltransférase du XyG, **tableau 4**) de façon conjointe dans les saccules *cis* et *median* ne s'oppose pas totalement à ce concept. Par ailleurs, des études biochimiques réalisées par Ray *et al.*, (1980) suggèrent que la biosynthèse du XyG implique deux activités enzymatiques simultanées : une activité β-1,4-glucane synthase pour former la chaîne principale du polymère et une activité xylosyltransférase pour initier sa ramification. Il serait intéressant par une approche semblable à celle menée dans nos travaux, de cartographier la protéine AtCSLC4 (Cocuron *et al.*, 2007). Une localisation similaire à celle de la xylosyltransférase AtXT1, pourrait alors renforcer l'hypothèse de leurs activités coopératives. De plus, ce type de données évoque la possible existence de complexes golgiens de synthèse des polysaccharides non cellulotiques. Enfin, au cours de ces travaux, deux enzymes d'interconversion des sucres ont été étudiées. Il s'agit de deux UDP-xylose-4-épimérases (UXE) permettant l'interconversion du D-xylose en L-arabinose. L'activité UXE a été démontrée pour la protéine MUR4-UXE1, qui est une protéine golgienne transmembranaire de type II. Les plantes mutantes *murus 4* (*mur4*) d'*Arabidopsis* ont des teneurs en arabinose pariétal plus faibles que les plantes sauvages (Burget *et al.*, 2003). La protéine UXE3 présente une homologie de séquence de plus de 76% avec MUR4. Cette UXE potentielle est une protéine cytoplasmique soluble pour laquelle, au cours de la thèse de S. Bernard, nous avons décrit une association au compartiment *median* des unités golgiennes, alors que MUR4 a été significativement détectée dans les vésicules du TGN. La détection de l'arabinosyltransférase potentielle, ARAD1 et de l'UDP-xylose épimérase potentielle, UXE3 au sein des mêmes saccules golgiennes suggère leur possible coopération au sein d'un complexe enzymatique.

Tableau 4 : Cartographie golgienne d'enzymes de synthèse des polysaccharides (PS) complexes par immunocytologie indirecte via la GFP. Les enzymes de synthèse du xyloglucane (XyG) et des chaînes pectiques rhamnogalacturonanes I (RGI) ont été cartographiées dans des suspensions cellulaires de *Nicotiana tabacum* exprimant les protéines chimères (enzyme-GFP). La méthyltransférase (AtQUA2) a été localisée dans les cellules de l'apex racinaire de plantules mutantes d'*Arabidopsis* exprimant la protéine de fusion AtQUA2-GFP. (*) : immunogold quantifié en appliquant le test de Mayhew (2002, 2011).

PS	Désignation	Code	Activité	Référence	Localisation enzyme-GFP
XyG	AtXT1	At3g62720	α -1,6-Xylosyltransférase	Faik <i>et al.</i> (2002) Cavalier et Keegstra (2006)	<i>cis</i> *, <i>median</i> *
	AtMUR3	At2g20370	β -1,2-Galactosyltransférase	Madson <i>et al.</i> (2003) Pena <i>et al.</i> 2004	<i>median</i> *
	AtFUT1	At2g03220	α -1,2-Fucosyltransférase	Perrin <i>et al.</i> (1999) Vanzin <i>et al.</i> (2002)	<i>trans</i> *
HG	AtQUA2	Atlg78240	Méthyltransférase potentielle	Mouille <i>et al.</i> (2007)	<i>trans</i> , TGN
RGI	AtARAD1	At2g35100	α -1,5-Arabinosyltransférase potentielle	Harholt <i>et al.</i> (2006)	<i>median</i> *
	AtUXE1, AtMUR4	At1g30620	UDP-xylose-4-épimérase	Burget et Reiter (1999) Burget <i>et al.</i> (2003)	TGN*
	AtUXE3	At2g34850	UDP-xylose-4-épimérase potentielle	Seifert (2004)	<i>median</i> *

5-2-1-5 Organisation en complexes golgiens d'enzymes de synthèse du XyG et des chaînes pectiques RGI

Etant données la complexité structurale des polysaccharides matriciels et la diversité moléculaire des acteurs impliqués dans leur biosynthèse, l'hypothèse de l'existence de complexes multienzymatiques golgiens entre ces acteurs a été émise (Seifert, 2004 ; Nguema-Ona *et al.*, 2006). Au cours des travaux de thèse de S. Bernard, notre objectif a été de mettre en évidence certains de ces complexes par deux approches : le système levure double hybride (ou *yeast two-hybrid*, Y2-H) et la technique d'imagerie *in vivo* de complémentation de fluorescence bi-moléculaire (ou *Bimolecular Fluorescence Complementation*, BiFC) (**Figure 11**). Les expérimentations utilisant le système Y2-H ont été entièrement réalisées dans le laboratoire du Dr Yumiko Sakuragi (Université de Copenhague), alors que la technique du BiFC a été mise en place dans notre laboratoire par le biais de cette même collaboration scientifique.

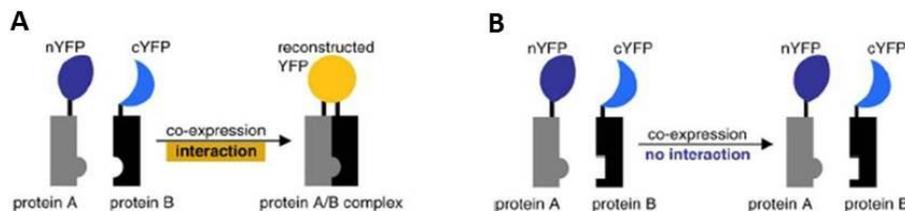


Figure 11: Schéma illustrant le principe de la technique de complémentation de fluorescence bi-moléculaire (*Bimolecular Fluorescence Complementation*, BiFC). Citovsky *et al.*, 2008.

La recherche d'interaction protéine-protéine est réalisée par la reconstruction de la *Yellow Fluorescent Protein* (YFP) ou d'autres variants de la GFP. La YFP est séparée en deux fragments portés par une protéine A et une protéine B. Ces deux protéines chimères sont co-exprimées de façon transitoire dans des cellules épidermiques de feuille de tabac. (A) En cas de forte proximité des protéines A et B, les deux portions YFP (YN : fragment Nterminal de la YFP ; YC : fragment Cterminal de la YFP) s'assemblent et émettent un rayonnement après excitation en microscopie confocale à balayage laser. (B) Si les protéines A et B sont distantes de plus de 100 Å, la YFP ne peut se reconstituer et aucune émission de fluorescence n'est observable après excitation.

Suite à la caractérisation biochimique et immunocytochimique d'un mutant d'épimérase d'Arabidopsis au laboratoire (Nguema Ona *et al.*, 2006), nous avons d'abord étudié de possibles interactions d'enzymes de synthèse du XyG. Ainsi, lors du stage de master 2 de R. Lamour, nous avons recherché d'éventuelles interactions entre la galactosyltransférase MUR3, enzyme transmembranaire de type II localisée dans les citernes *median* de l'appareil de Golgi (Chevalier *et al.*, 2010-**ACL08**), et l'UDP-glucose 4 épimérase, enzyme soluble à double localisation cytoplasmique et golgienne (Barber *et al.*, 2006) impliquée dans la galactosylation du XyG (Nguema-Ona *et al.*, 2006) (**tableau 4**). Secondairement, suite aux résultats de cartographie d'enzymes potentiellement impliquées dans la biosynthèse des ramifications des chaînes pectiques RGI (**tableau 4**), nous avons étudié la formation d'homo et/ou hétéro-dimères associés aux membranes golgiennes, entre les protéines ARAD1, UXE3, et RGP (Reversibly Glycosylated peptides) 1 et 2 (**tableau 5**). Plusieurs études montrent que ces trois protéines pourraient être responsables de l'incorporation d'arabino au sein des chaînes pectiques RGI (Seifert *et al.*, 2004 ; Harohlt *et al.*, 2006 ; Rautengarten *et al.*, 2011). Comme précédemment décrit, nous avons cartographié au sein des mêmes compartiments golgiens l'arabosyltransférase potentielle ARAD1, et l'UDP-xylose-4-épimérase potentielle, UXE3. Alors que les UXE produisent de l'UDP-arabinopyranose, les arabosyltransférases utilisent majoritairement comme substrat de l'UDP-arabinofuranose (**Figure 12**). Une activité arabinose-mutase assurant la conversion de l'UDP-arabinopyranose en UDP arabinofuranose, initialement identifiée chez le riz (Konishi *et al.*, 2007), a été décrite récemment chez Arabidopsis (Rautengarten *et al.*, 2011). Cette activité mutase est attribuée à des peptides solubles à double localisation cytoplasmique et golgienne (Dhugga *et al.*, 1997 ; Drakakaki *et al.*, 2006), connus sous le nom de Reversibly Glycosylated Peptides (RGPs).

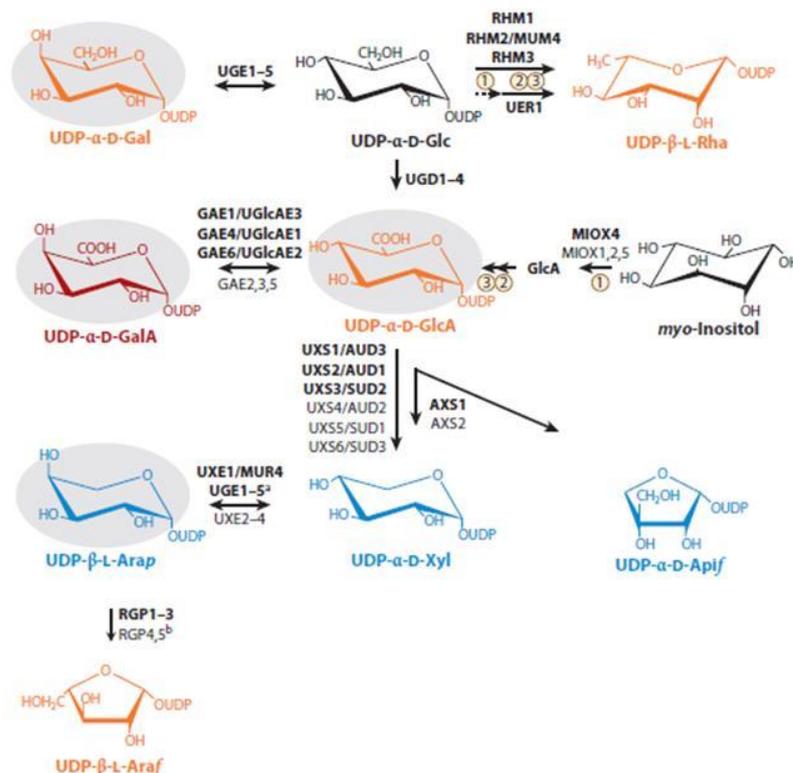


Figure 12: Schéma illustrant l'interconversion des nucléotide-sucres à partir de l'UDP-α-D-glucose (UDP-α-D-Glc) chez Arabidopsis. D'après **Atmodjo *et al.*, 2013**.

Les enzymes d'interconversion pour lesquelles l'activité a été caractérisée sont inscrites en gras.

UGEs, UDP-Glc-4-epimerases/UDP-Gal-4-epimerases; RHMs, tri-activity enzymes with UDP-Glc-4,6-dehydratase, UDP-4-keto-6-deoxy-D-Glc-3,5-epimerase, and UDP-4-keto-L-Rha-4-keto-reductase activities; UER1, bi-activity enzyme with UDP-4-keto-6-deoxy-D-Glc-3,5-epimerase and UDP-4-keto-L-Rha-4-keto-reductase activities; UGDs, UDP-Glc-dehydrogenases; GAEs/UGlCAEs, UDP-GlcA-4-epimerases; UXSs, UDP-GlcA-decarboxylases/UDP-Xyl-synthases; AXSs, UDP-D-Apif/UDP-D-Xyl-synthases; MIOXs, myo-inositol-oxygenases; UXEs, UDP-Xyl-4-epimerases/UDP-Ara-4-epimerases; RGP, UDP-L-Arap-mutases. Autres dénominations: MUM4, MUCILAGE-MODIFIED4; AUDs, membrane-anchored UDP-D-GlcA decarboxylases; SUDs, soluble UDP-D-GlcA-decarboxylases; MUR4, MURUS4.

L'ensemble des résultats obtenus sont présentés dans le **tableau 5** ci-après. Comme cela a déjà été rapporté pour d'autres glycosyltransférases de biosynthèse des polymères non cellulotiques par des approches microscopiques ou biochimiques (Atmodjo *et al.*, 2011 ; Chou *et al.*, 2012 ; Harholt *et al.*, 2012), nous avons montré que les glycosyltransférases β (1-2)-galactosyltransférase (MUR3) et α (1-5)-arabinosyltransférase (ARAD1), se dimérisent au sein des membranes golgiennes. En accord avec les travaux de Langeveld *et al.*, (2002) et Drakakaki *et al.*, (2006), nous avons mis en évidence la formation d'homo et hétérodimères entre les UDP-arabinose-mutases (UAM), RGP1 et RGP2. Malgré le fait que les épimérasés UGE4 et UXE3 soient toutes deux des protéines solubles à localisation cytoplasmique et golgienne, seule l'épimérase UGE4 semble former des hétérodimères associés aux membranes golgiennes. Alors que l'existence d'hétérodimères entre différentes isoformes de glycosyltransférases impliquées dans la synthèse du XyG (Chou *et al.*, 2012), des chaînes pectiques HG (Atmodjo *et al.*, 2011) et RGI (Harholt *et al.*, 2012 ; Sogaard *et al.*, 2012) a été récemment révélée, l'existence d'hétérocomplexes protéiques golgiens entre des GTs et des enzymes d'interconversion des sucres n'a jamais été décrite à ce jour. Les mises en œuvre des méthodologies de complémentarité bi-moléculaire de fluorescence et/ou du système levure double hybride, ne nous ont pas permis de mettre en évidence ce type d'interaction. Dans ces deux approches, la fusion des marqueurs en position N-terminale des protéines transmembranaires de type II, MUR3 et ARAD1, modifie respectivement la localisation et la fonctionnalité des protéines de fusion. Le système Y2-H a cependant renseigné le fait que l'épimérase UXE3 ne semble pas interagir avec les UDP-arabinose-mutases RGP1 et RGP2. Des approches biochimiques de type co-immunoprécipitation pourraient être envisagées pour compléter ces données. La cartographie au sein des membranes golgiennes des GTs, des enzymes d'interconversion des sucres et des transporteurs, couplée à l'étude des interactions entre ces différents acteurs moléculaires demeure un enjeu majeur dans la compréhension des processus de biosynthèse des polysaccharides complexes au sein de l'appareil de Golgi.

Tableau 5 : Identification d'homo et hétérodimères potentiellement impliqués dans la synthèse du XyG et des ramifications des chaînes pectiques RGI. Les approches *Bimolecular Fluorescence Complementation* (BiFC) et *yeast two-hybrid*, (Y2-H) ont été utilisées. Les couleurs rose foncé, rose clair et bleu ciel indiquent respectivement la détection d'homodimère, la détection d'hétérodimère et l'absence de détection de dimère. ARAD1, *arabinan deficient 1* ; MUR3, *murus 3* ; *nd*, dimérisation non détectée ; RGPs, *reversibly glucosylated peptide* ; UGE, *UDP-Glucose-4-epimerase* ; UXE, *UDP-xylose-4-epimerase*.

PS	Désignation	Dimérisation					
		AtMUR3	AtUGE4	AtARAD1	AtUXE3	AtRGP1	AtRGP2
XyG	AtMUR3 β -1,2-Galactosyltransférase (Madson <i>et al.</i> , 2003 ; Pena <i>et al.</i> , 2004)	oui (BiFC)	<i>nd</i> (BiFC)				
	AtUGE4 UDP Glc-Epimérase (Barber <i>et al.</i> , 2006)	<i>nd</i> (BiFC)	oui (BiFC)				
RGI	AtARAD1 α -1,5-Arabinosyltransférase potentielle (Harholt <i>et al.</i> , 2006)	oui (BiFC)	<i>nd</i> (Y2-H)	<i>nd</i> (Y2-H)	<i>nd</i> (Y2-H)	<i>nd</i> (Y2-H)	
	AtUXE3 UDP-Xylose-4-épimérase potentielle (Seifert, 2004)	<i>nd</i> (Y2H)	non (Y2-H)	non (Y2-H)	non (Y2-H)	non (Y2-H)	
	AtRGP1 UDP-Arabinose _p -mutase (Delgado <i>et al.</i> , 1998 ; Konishi <i>et al.</i> , 2007)	<i>nd</i> (Y2H)	non (Y2-H)	oui (Y2-H)	oui (Y2-H)	oui (Y2-H)	
	AtRGP2 UDP-Arabinose _p -mutase (Drakakaki <i>et al.</i> , 2006)	<i>nd</i> (Y2H)	non (Y2-H)	oui (Y2-H)	oui (Y2-H)	oui (Y2-H)	

L'ensemble de ces travaux de recherche a donné lieu à :

6 publications dans des revues à comité de lecture :

ACL04- Pagny *et al.* (2003) *The Plant Journal*. 33 : 189-203.

ACL05- Follet-Gueye *et al.* (2003) *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 51 : 931-940.

ACL06- Saint-Jore Dupas *et al.* (2006) *The Plant Cell*. 18 : 3182-3200.

ACL08- Chevalier *et al.* (2010) *The Plant Journal*. 64 : 977-989.

ACL09- Chevalier *et al.* (2011) *Journal of Biological Research*. 16 : 212-216.

ACL11- Driouich *et al.* (2012) *Frontiers in Plant Science*. doi : 10.3389/fpls.2012.00079.

1 publication soumise:

ACL17- Bernard *et al.* The Golgi compartmentalization of rhamnogalacturonan I associated epitopes and enzymes potentially involved in arabinan biosynthesis in tobacco BY-2 suspension-cultured cells. *The Plant Journal*. Soumis le 18 Octobre 2013.

1 chapitre de livre:

OS04- Follet-Gueye *et al.* (2012) *In Applications of Immunocytochemistry*. Ed. Hesam Dehghani ISBN 978-953-51-0229-8. pp 297-320.

5-2-2 Implication des cellules apparentées aux cellules bordantes dans les interactions plante(s)-pathogène(s)

5-2-2-1 Les cellules frontières de la racine

Initialement caractérisées chez le pois (Hawes *et al.*, 2000), les cellules frontières furent appelées cellules bordantes (ou *Border cells*, BCs) (**Figure 13A**). Les cellules frontières de type BCs sont les cellules périphériques de la coiffe qui se détachent individuellement en masse de la racine lorsque celle-ci est plongée dans l'eau (**Figure 13B**). En condition naturelle, le contact de l'apex avec l'eau de pluie ou d'irrigation entraîne le gonflement du mucilage qui entoure les cellules et ceci conduit à leur expulsion rapide. Au laboratoire, le Dr M. Vicré-Gibouin (2005) a montré que les cellules frontières des Brassicacées se distinguent des cellules bordantes précédemment décrites, du fait de leur mode de détachement particulier. Chez *Arabidopsis thaliana*, par exemple, ces cellules présentent la caractéristique d'être organisées en files de cellules superposées et adhérant les unes aux autres. En aucun cas, elles ne se dispersent en solution, de façon individuelle, comme les cellules bordantes des autres espèces étudiées (Vicré *et al.*, 2005 ; **Figure 13C**). Afin de souligner leur organisation particulière, elles ont été baptisées « cellules apparentées aux cellules bordantes » (ou *Border-Like Cells*, BLCs) et non cellules bordantes (Vicré *et al.*, 2005). Outre les plantes appartenant à la famille des Brassicacées, d'autres plantes d'intérêt agronomique tel le lin produisent également des BLCs (Driouich *et al.*, 2011-**OS03**). Contrairement à ce qui a été longtemps cru, les cellules frontières restent vivantes et jouent un rôle clef dans l'interface sol-racine en produisant des constituants moléculaires spécifiques tels que des polysaccharides et de l'ADN extracellulaire (Wen *et al.*, 2009 ; Durand *et al.*, 2009-**ACL07** ; Driouich *et al.*, 2007 ; Driouich *et al.*, 2013-**ACL13**). Alors que la fonction de défense des BCs vis-à-vis de stress biotiques et abiotiques est bien documentée (Hawes *et al.*, 2012), l'implication des BLCs dans les interactions plante(s)-pathogène(s) reste à démontrer.

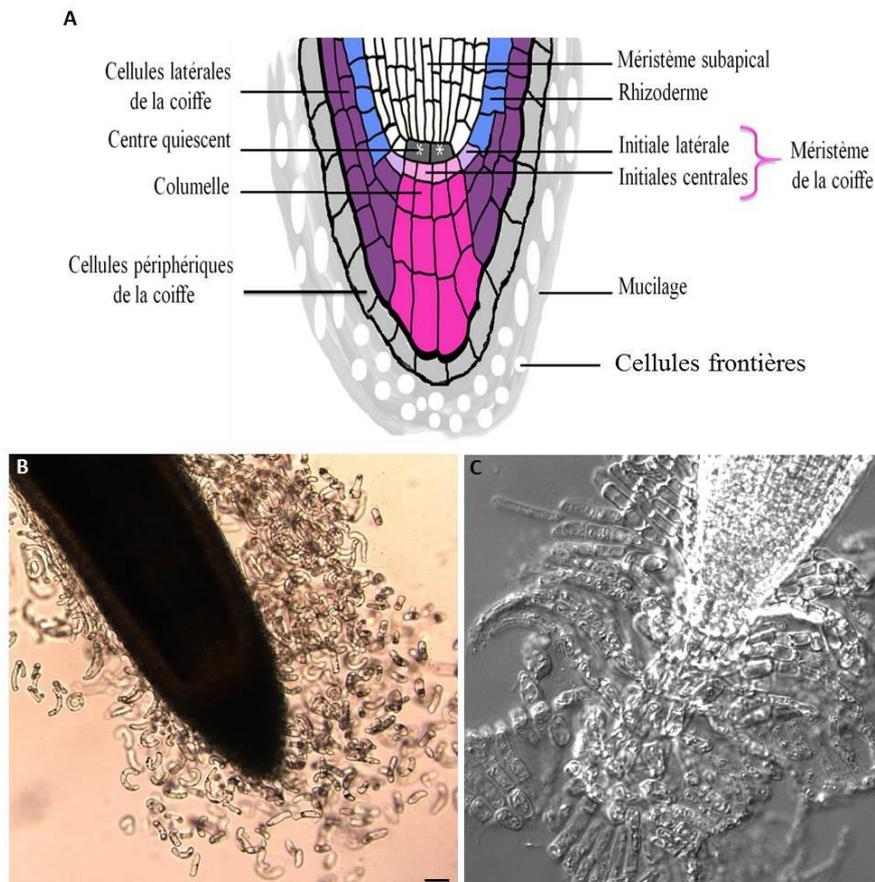


Figure 13: Les cellules frontières des racines : origine et diversité morphologique.

(A)-Schéma explicatif de l'origine des cellules frontières (D'après **Bennett et al., 2010**). Chez les plantes angiospermes dicotylédones, les initiales centrales du méristème de coiffe sont à l'origine de la columelle entourée des cellules latérales de coiffe produites par les initiales latérales. Au cours de leur progression vers l'extrémité de la racine (progression due à l'activité continue du méristème de la coiffe), les cellules de la columelle et les cellules latérales de la coiffe vont former l'assise la plus externe de la coiffe, les cellules périphériques. Au cours d'une dernière étape de différenciation, les cellules périphériques se détachent de la coiffe et sont libérées dans la rhizosphère. Elles sont alors appelées cellules frontières. Chez le pois (B), **Driouich et al., 2011-OS03**), les cellules frontières sont libérées individuellement dans la rhizosphère et sont appelées cellules bordantes (*Border Cells, BCs*). Chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana* (C), **Vicré et al., 2005**) les cellules frontières restent adhérentes les unes aux autres et à l'extrémité de la coiffe, elles sont appelées, cellules apparentées aux cellules bordantes (*Border-Like Cells, BLCs*). Barre d'échelle : 20 µm.

5-2-2-2 Le système immunitaire végétal

Chez les végétaux, la paroi cellulaire constitue un premier rempart vis-à-vis des stress environnementaux. Contrairement aux organismes animaux pour lesquels les défenses innée et adaptative sont régulées par des cellules dédiées (cellules dendritiques, cellules de Langherans, macrophages, kératinocytes, lymphocytes), cette spécialisation cellulaire n'existe pas chez les plantes. Ainsi toute cellule végétale peut potentiellement, au contact d'un agresseur microbien par exemple, développer des réactions de défense.

La stimulation du système immunitaire végétal repose sur la reconnaissance de signaux appelés éliciteurs, capables d'induire la mise en place de mécanismes de défense. En 2006, Jones et Dangl proposent un modèle dit « en zigzag » pour décrire le fonctionnement du système immunitaire végétal lors d'infections par des agents microbiens pathogènes (Figure 14). En premier lieu, la présence du phytopathogène est détectée après pénétration à travers la paroi végétale ou *via* une blessure, suite à la perception des molécules associées aux agents microbiens, nommés *Pathogen-*

Associated Molecular Patterns (PAMPs) (Zipfel et Felix, 2005) et/ou de fragments pariétaux issus de la cellule végétale, les DAMPs (*Damage-Associated Molecular Patterns*) par des récepteurs membranaires, les *Pathogen Recognizing Receptors* (PRRs). La plupart des PAMPs sont des oligosaccharides, des glycopeptides et des peptides. Ce premier niveau de reconnaissance déclenche la mise en place de l'immunité primaire appelée PTI (*Pattern-Triggered Immunity*) et permet de protéger la plante efficacement contre la plupart des invasions pathogènes. A l'échelle cellulaire, la PTI se traduit très rapidement (1-5min) par des flux d'ions, la dépolarisation des membranes et une surproduction des formes actives de l'oxygène (FAO ou *Reactive Oxygen Species*, ROS). Les FAO sont essentiellement générées par l'activité NADPH oxydase membranaire et comprennent le radical superoxyde (O₂⁻), le radical hydroxyde (HO⁻), le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et l'oxygène singulet (¹O₂). Une augmentation de la production de monoxyde d'azote (NO) est souvent associée à la production de FAO. Ces composés oxygénés interviennent dans la signalisation (activation de protéines de phosphorylation/déphosphorylation, *Mitogen-Activated Protein Kinases*, MAPKs), la régulation de l'expression des gènes de défense et dans le renforcement pariétal (remodelage des extensines pariétales) pour limiter la progression de l'agent infectieux. La PTI peut plus tardivement se traduire par la production de phytoalexines. Enfin, parmi les réponses cellulaires les plus tardives (de quelques heures à quelques jours) des dépôts de callose et des retards de croissance sont couramment observés (Boller et Felix, 2009 ; Millet *et al.*, 2010).

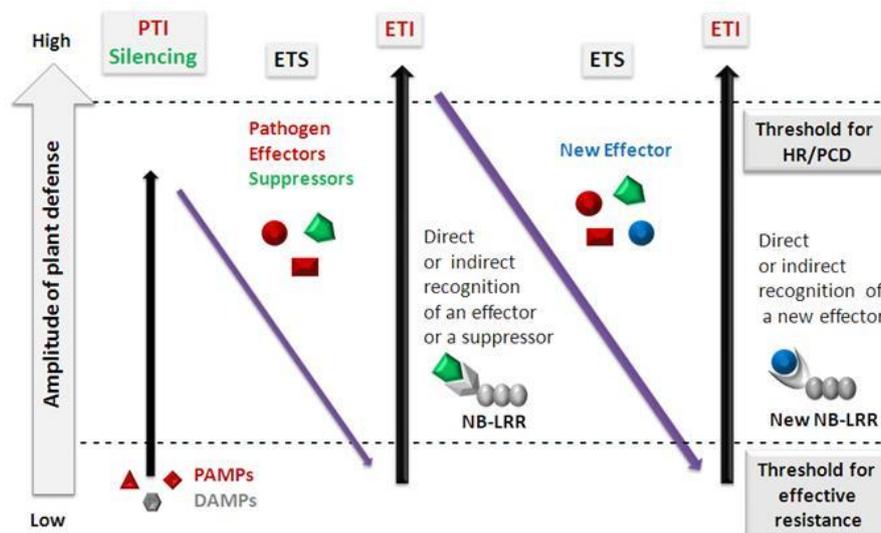


Figure 14: « Modèle en zigzag » illustrant le fonctionnement du système immunitaire végétal. Jones et Dangl, 2006 ; Zvereva et Pooggin, 2012.

Les plantes détectent les PAMPs microbiens *via* les récepteurs PRRs et mettent en place la résistance PTI. Secondairement, les effecteurs microbiens répriment la PTI et entraînent la susceptibilité de l'hôte (ETS). Enfin, les effecteurs (Avr) (en rouge) sont reconnus par des récepteurs intracellulaires de type *Nod-like (Nucleotide oligomerisation domain) receptors*, nommés NB-LRR, qui déclenchent la résistance spécifique (ETI). L'ETI s'accompagne souvent de la réaction hypersensible (ou *hypersensitive response*, HR) et de la résistance systémique acquise. L'apparition de souches microbiennes capables de s'opposer à l'ETI et de restaurer l'ETS chez la plante peut alors avoir lieu. Dans ce cas, les plantes s'adaptent en générant de nouvelles protéines de défense (nouveaux récepteurs NB-LRR) capables de reconnaître ces nouveaux effecteurs et de restaurer l'ETI. Ce dialogue moléculaire qui se déroule lors de l'infection des plantes par un pathogène est parfois décrit sous la dénomination de réponse « gène pour gène ».

Avr, Facteur d'Avirulence; ETI, *Effector-Triggered Immunity*, ETS, *Effector-Triggered Susceptibility*, HR, *Hypersensitive response*; PAMPs, *Pathogen-Associated Molecular Patterns*; PRRs, *Pattern Recognition Receptors*; PTI, *PAMP-Triggered Immunity*.

Certains phytopathogènes contournent l'immunité primaire en sécrétant des effecteurs (facteurs de virulence) qui en s'opposant à la PTI favorisent l'infection. Ces facteurs de virulence sont parfois considérés comme des éliciteurs spécifiques (Figure 14) et sont de nature protéique. Cette phase, où

les effecteurs microbiens inhibent la PTI, est appelée ETS (*Effector-Triggered Susceptibility*) puisque la plante devient sensible. Des récepteurs cytoplasmiques, nommés protéines de résistance R ou NB-LRR (*Nucleotide Binding-Leucine Rich Repeat*), peuvent alors être synthétisés. La reconnaissance des facteurs de virulence par ces nouveaux récepteurs intracellulaires déclenche un second niveau d'immunité ou immunité secondaire plus spécialisée: l'ETI (*Effector-Triggered Immunity*). Les effecteurs qui déclenchent l'ETI sont alors qualifiés de facteurs d'avirulence (Avr). Les réponses immunitaires primaire, PTI et secondaire, ETI se caractérisent par des réponses cellulaires semblables avec toutefois des intensités de réponse plus importantes lors de la réponse immunitaire spécialisée de type ETI. La PTI et l'ETI peuvent conduire à la réaction hypersensible (*Hypersensitive reaction*, HR). La HR correspond à une mort cellulaire programmée des cellules localement sur le lieu de l'infection, ce qui permet de confiner l'agent infectieux dans une zone restreinte. De plus, ces cellules émettent des signaux permettant d'induire une résistance vis-à-vis du pathogène dans la zone adjacente à l'infection. Il s'agit de la résistance locale acquise (*Local acquired resistance*, LAR). Puis, de façon plus globale, des signaux sont émis dans les tissus non infectés, c'est la résistance systémique acquise (SAR). L'établissement de la SAR fait intervenir comme molécule signal des phytohormones dont l'acide salicylique (*Salicylic acid*, SA). Une autre voie, indépendante de l'AS, appelée résistance systémique induite (*Induced systemic resistance*, ISR) est régulée par deux autres phytohormones, l'acide jasmonique et l'éthylène.

La réponse immunitaire primaire induite par les PAMPs et les DAMPs peut aussi être activée par des motifs moléculaires issus de microorganismes bénéfiques, ces éliciteurs microbiens sont nommés *Microbe-Associated Molecular Patterns* (MAMPs) (Zipfel *et al.*, 2006). L'usage des MAMPs et dans une moindre mesure des DAMPs, comme agents de bio-contrôle destinés à prémunir la plante contre l'invasion de pathogène, fait l'objet de nombreux travaux (Henry *et al.*, 2012). Outre les éliciteurs microbiens d'origine pathogène ou non, des éliciteurs biologiques, isolés d'algues ou de crustacés (Fliegmann *et al.*, 2004) et des éliciteurs chimiques (Hong *et al.*, 1999) peuvent également induire une réponse immunitaire primaire. Un des enjeux de la recherche en physiologie immunitaire végétale repose actuellement sur l'identification de nouveaux éliciteurs utilisables en agriculture pour palier à l'usage des pesticides (Henry *et al.*, 2012 ; **Figure 15**).

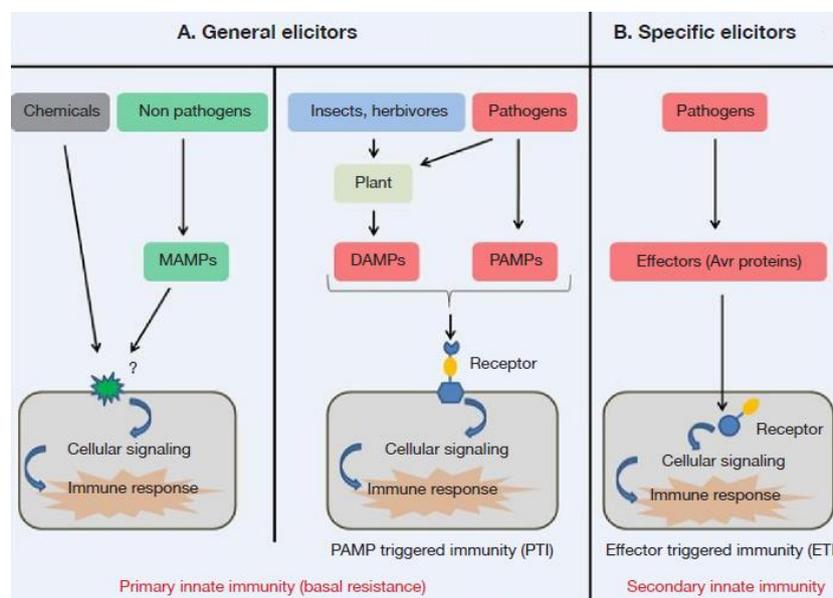


Figure 15: Diversités des éliciteurs. Henry *et al.*, 2012.

(A), Les éliciteurs généraux sont impliqués dans l'immunité innée primaire. Ils comprennent les produits phytopharmaceutiques, les profils moléculaires associés aux agents microbiens non pathogènes (*Microbe-Associated Molecular Patterns*, PAMPs), les profils moléculaires associés aux dommages (*Damage- Associated Molecular Patterns*, DAMPs), et les profils moléculaires associés aux pathogènes (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*, PAMPs). (B), Les éliciteurs spécifiques ou effecteurs sont formés par les pathogènes et induisent l'immunité secondaire uniquement chez les plantes possédant le gène de résistance correspondant.

5-2-2-3 Réponses des BLCs du lin : *Linum usitatissimum* à une élicitation

Dans l'axe agronomique des recherches menées au laboratoire (**axe 2**), je porte actuellement avec le Dr M. Vicré-Gibouin le projet qui vise à mettre en évidence la fonction des BLCs dans les interactions plante(s)-pathogène(s) (**Figure 2**). Dans ce cadre, j'ai co-encadré le stage de master 2 de Rim Jaber de septembre 2011 à juillet 2012. Au cours de ces travaux, la caractérisation morphologique des BLCs du lin et les réponses possibles des BLCs à des éliciteurs fongiques et bactériens ont été successivement étudiées.

La caractérisation morphologique des BLCs de lin, réalisée par MO et MET (**Figure 16**), confirme une organisation en files de cellules adhérentes à l'apex racinaire similaire à celle décrite chez les Brassicacées et plus spécifiquement chez *A. thaliana* (Vicré *et al.* 2005 ; Driouich *et al.*, 2007). Les observations d'apex racinaires de lin par microscopie confocale ont permis de distinguer trois populations de cellules : les BLCs centrales (BLCc) de forme arrondie, les BLCs latérales (BLCI) allongées et les paquets de BLCs filamenteuses (BLCf) éloignées de la pointe racinaire. La différence morphologique entre les trois populations cellulaires résulte probablement de leur origine distincte. Les BLCc sont probablement issues de la columelle, tandis que les BLCI et BLCf dériveraient des cellules latérales de coiffe. Les études ultrastructurales des BLCc et des BLCI ont été essentielles pour approfondir nos connaissances à propos de ces deux types cellulaires. Ces analyses ont montré que les BLCc présentent un cytoplasme très dense et riche en organites. Elles contiennent de nombreuses mitochondries et possèdent un appareil de sécrétion bien développé (réticulum endoplasmique, empilements golgiens et vésicules de sécrétion), comparativement aux BLCI dont le cytoplasme est pauvre en organites et poussé vers la membrane plasmique par une énorme vacuole. Ces données ultrastructurales suggèrent un rôle possible des BLCs proches de la coiffe dans la protection du méristème racinaire lors de stress biotiques ou abiotiques.

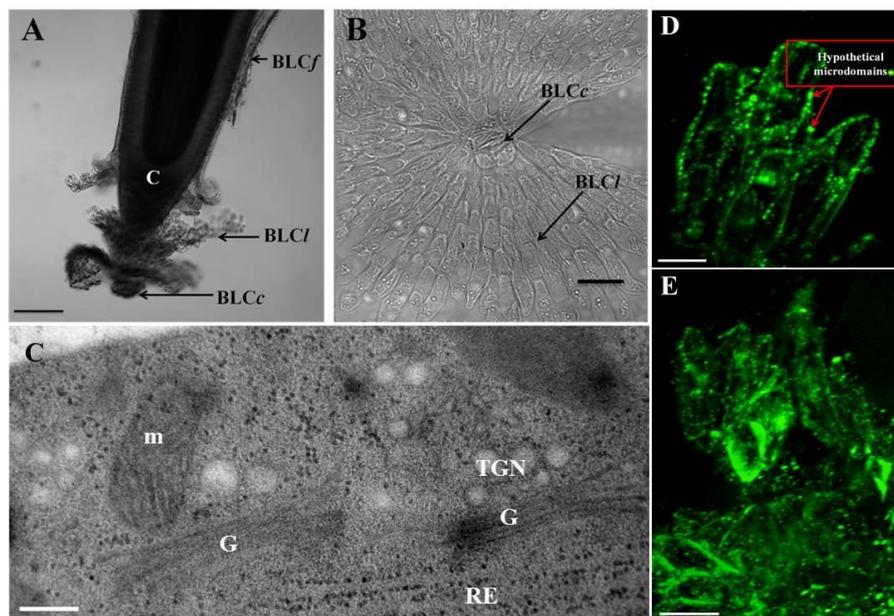


Figure 16: Morphologie cellulaire et subcellulaire des BLCs de lin et réponse à une élicitation bactérienne.

Des apex racinaires de plantules de lin âgées de 5 jours ont été observés en microscopie optique (**A, B**). Alors que les BLCc arrondies et les BLCI allongées sont localisées à proximité de la pointe racinaire, les BLCf sont éloignées de l'apex. Les BLCc observées en MET (**C**) présentent un cytoplasme riche en mitochondries, réticulum endoplasmique et empilements golgiens. L'immunomarquage d'épitopes associés aux extensines par l'anticorps LM1 a été réalisé à la surface des BLCc et BLCI avant (**D**) et après élicitation par le peptidoglycane (**E**). Les microdomaines hypothétiques observés chez le témoin (**D**) ont tendance à s'étendre après élicitation (**E**). BLC, *Border-Like Cell*; BLCc, BLC centrales; BLCf, BLC filamenteuses; BLCI, BLC latérales; C, coiffe; G, Golgi; m, mitochondrie; RE, réticulum endoplasmique; TGN, réseau trans golgien; barres d'échelle : A, D et E, 100 μ m; B, 20 μ m; C, 0.1 μ m.

Afin de déterminer si les BLCs de lin sont impliquées dans la défense racinaire, nous avons tout d'abord examiné la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), dans les BLCs suite à une élicitation par des molécules bactériennes (peptidoglycane, PGN ; flagelline 22, flg22) ou fongiques (acide fusarique, AF). Cette analyse a été menée par une approche cytochimique à l'échelle de la microscopie confocale à balayage laser *via* l'utilisation de sondes fluorescentes spécifiques des ROS, *Singlet Oxygen Sensor Green*, SOSG (Flors *et al.*, 2006) et *5,6-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein-diacetate*, CM-H₂DCFDA (Kristiansen *et al.*, 2009). Ces études ont montré que les BLCs de lin sont capables de produire des ROS en réponse à ces différents éliciteurs. Les BLCs centrales entourant la pointe racinaire, répondent avant les BLCs latérales. Pour déterminer si les BLCs sont impliquées dans la mise en place de mécanismes de défense à plus long terme, nous avons exploré la distribution des extensines à la surface des parois cellulaires par une approche immunocytochimique (**Figure 16D, 16E**). En l'absence d'élicitation, l'immunolocalisation des extensines (anticorps monoclonal LM1, *Leeds Monoclonal 1, Plante Probes*) montre une organisation particulière de ces glycoprotéines en microdomaines hypothétiques au niveau de la paroi des (BLCc et BLCI) de lin. Cette distribution des épitopes reconnus par l'anticorps LM1 est sensiblement modifiée en réponse à l'élicitation, où aux microdomaines pariétaux précédemment décrits, s'ajoutent des plages fluorescentes plus étendues. Ces résultats suggèrent une réorganisation des extensines au sein des parois des BLCs permettant une modification des propriétés mécaniques de la paroi. En effet, ces protéines pariétales offrent une résistance mécanique accrue aux cellules en inhibant la progression de l'agent pathogène (Xie *et al.*, 2012). La présence d'extensines dans la paroi des BLCs de lin, cellules situées à l'interface racine-rhizosphère, suggère leur implication dans la défense contre des attaques par des pathogènes. L'ensemble de ces éléments indique que les BLCs mettent en place des mécanismes de défense ne se limitant pas à la production de ROS.

L'ensemble de ces travaux de recherche a donné lieu à :

4 articles dans des revues à comité de lecture:

ACL07- Durand *et al.* (2009). *Plant Physiology*. 150 : 1411–1421.

ACL12- Cannesan *et al.* (2012). *Plant Physiology*. 159(4) : 1658-70.

ACL13- Driouich *et al.* (2013). Root border cells and secretions as critical elements in plant host defense. *Current Opinion in Plant Biology*. 16 : 489-495.

ACL16- Plancot *et al.* (2013). *Plant Physiology*. *In press*.

1 chapitre de livre :

OS03- Driouich *et al.* (2011). Unity is strength : the power of border cells and border-like cells in relation with plant defense. *In Secretions and Exudates in Biological Systems, Signalling and Communication in Plants*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp 97-107.

Depuis le 1^{er} Octobre 2012, ce travail se poursuit dans le cadre de la thèse de Rim Jaber que je co-dirige avec le Pr JC Mollet. Cette thèse intitulée « Sélection de nouvelles substances naturelles de défense des plantes (SDP) et caractérisation des réponses moléculaires » bénéficie d'un financement régional *via* le GRR VASI. Suite à un premier criblage de 2500 composés naturels d'origine végétale issus d'une chimiothèque, 5 molécules ont été retenues pour leurs effets éliciteurs observés sur des suspensions cellulaires de tabac et des plantules d'*Arabidopsis*. Au cours de cette thèse, la stimulation des mécanismes de défense par ses 5 composés est étudiée chez deux variétés de lin, l'une tolérante et l'autre sensible à l'agent fongique pathogène *Fusarium oxysporum*. Dans un premier temps, une détection des marqueurs de défense induits par l'élicitation est conduite. Elle consiste tout d'abord à déterminer si les 5 molécules retenues induisent 1) la production de ROS chez des plantules de lin (au niveau des racines, BLCs et feuilles), et 2) le renforcement des parois cellulaires *via* des dépôts de callose, de lignine et un remodelage des extensines. Ces différentes phases sont appréhendées par des approches cytochimiques ou immuno-cytochimiques en microscopie confocale à balayage laser et MET (PRIMACEN). Sur les molécules entraînant une

réponse des plantules de lin, des analyses d'expression des gènes de défense PR (*pathogenesis related genes*) sont réalisées par une approche qPCR après extraction des ARN dans les différents organes (racines, tiges et feuilles). Enfin des analyses du profil protéique sont effectuées par électrophorèse bidimensionnelle et les spots sont analysés par protéomique afin de déterminer si l'élicitation a induit la production des protéines PRs (*pathogenesis related proteins*) (plate-forme de Protéomique PISSARO, GRR CBS, IRIB).

5-2-3 Glycomolécules végétales et immunité cutanée en lien avec l'écologie microbienne de la peau

Cette composante de mes activités de recherche a débuté en décembre 2010 avec le programme « SkinOFlor » labellisé par le pôle de compétitivité de la *Cosmetic Valley*. Ce programme intitulé « **Produits Cosmétiques Bio-actifs en lien avec l'Écologie Microbienne de la peau** » a réuni 5 partenaires : 2 partenaires du secteur public universitaire, les laboratoires Glyco-MEV et LMSM (Laboratoire de Microbiologie du Froid, Signaux et Microenvironnement) de l'Université de Rouen, et 3 partenaires du secteur privé, les laboratoires dermatologiques Uriage (LDU, Courbevoie, porteur du projet), les entreprises Bio-EC (Longjumeau) et Bio-Europe du Groupe Solabia (Anet).

Cette activité de recherche a été réalisée au cours de la thèse du **Dr Giuseppe Percoco** avec le soutien d'un ingénieur d'étude en microscopie (Y. Ramdani, CDD 2.5 ans) et du Dr Magalie Bénard (PRIMACEN, service de microdissection laser et analyses qPCR).

5-2-3-1 Structure de la peau

La peau est le plus grand organe de l'organisme jouant un rôle majeur de protection vis à vis des stress biotiques et abiotiques de l'environnement. Elle est constituée de 3 couches tissulaires distinctes superposées : l'**hypoderme**, le **derme** et l'**épiderme**. La plupart des fonctions protectrices de la peau est assurée par l'**épiderme** (**Figure 17**).

L'**épiderme**, la couche la plus externe de la peau, est un épithélium pavimenteux stratifié kératinisé composé essentiellement de cellules appelées **kératinocytes** (**Figure 17**). Au sein de l'épiderme, d'autres types cellulaires sont également présents, tels que les mélanocytes, les cellules de Merkel, les cellules de Langherans et occasionnellement les cellules T cytotoxiques CD8+ (Nestle *et al.*, 2009). L'épiderme, dont l'épaisseur peut varier de 60 à 120 µm, est constitué de quatre couches cellulaires superposées, caractérisées par leur position, leur morphologie et leur degré de différenciation : la couche basale ou *stratum basale* (SB), la couche épineuse ou *stratum spinosum* (SP), la couche granuleuse ou *stratum granulosum* (SG) et la couche cornée ou *stratum corneum* (SC). Il est admis que les kératinocytes migrent de la couche basale vers la couche épineuse puis vers la couche granuleuse, en changeant de forme et en synthétisant des fibres de kératine spécifiques, d'autres protéines telles que la filaggrine et l'involucrine et des lipides. Au sein de la couche superficielle de la peau, la couche cornée, les kératinocytes alors appelés cornéocytes, ont atteint le stade ultime de différenciation. Les cornéocytes sont des cellules mortes anuclées dont le cytoplasme est constitué principalement d'une matrice fibreuse riche en kératine et filaggrine. Les cornéocytes sont ensuite éliminés par le processus de desquamation et remplacés continuellement par des cellules de la couche inférieure. Ce programme de différenciation a une durée d'environ 30 jours.

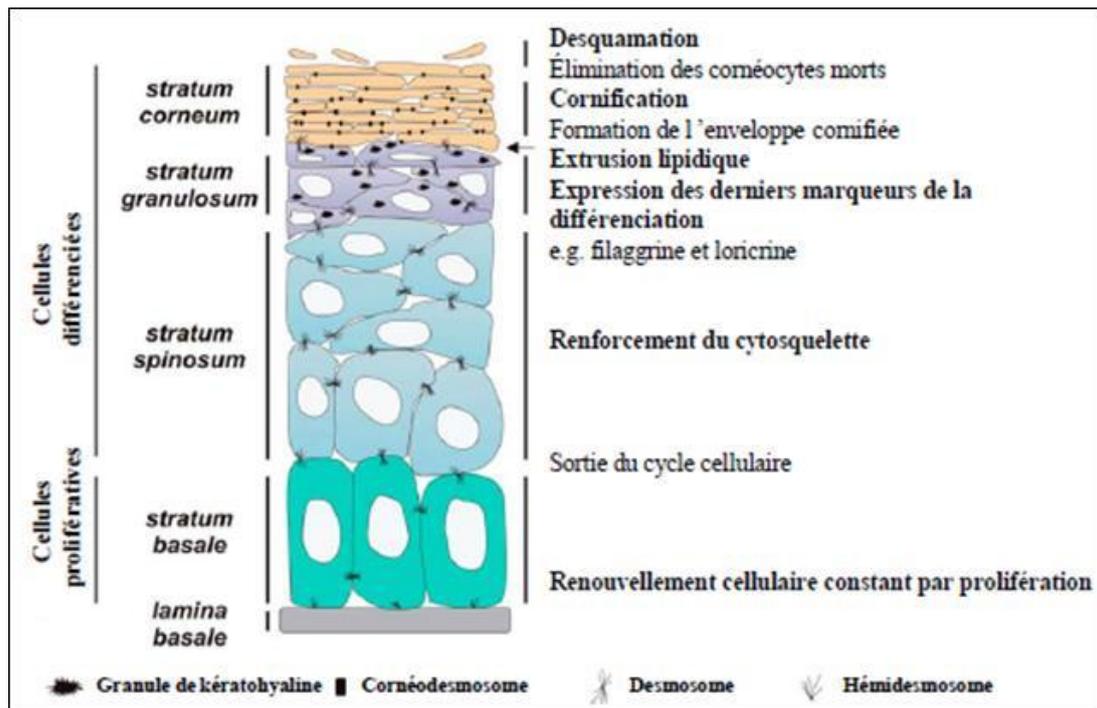


Figure 17: Structure de l'épiderme. Denecker *et al.*, 2008.

L'épiderme est un épithélium stratifié. Les kératinocytes, le type cellulaire le plus représenté, se différencient en migrant de la couche basale vers la couche épineuse, puis vers la couche granuleuse en synthétisant des protéines marqueurs de la différenciation telles que la filaggrine et l'involucrine et des lipides. Le *stratum corneum*, couche la plus superficielle de la peau, est caractérisé par la présence de cellules mortes, appelées cornéocytes, qui sont enveloppées dans une matrice extracellulaire de nature hydrophobique constituée par des protéines, telles que l'involucrine et la loricrine, liées à des lipides tels que les céramides, les acides gras et le cholestérol.

5-2-3-2 Les propriétés «barrières» de la peau et la défense innée

La peau, organe le plus superficiel de l'organisme, constitue la première zone d'interaction avec l'environnement. Parmi les fonctions « barrières » de la peau, on distingue classiquement les notions de « barrière biophysique » et de « barrière biologique ». La première est assurée essentiellement par la couche cornée, alors que la seconde implique l'ensemble des assises épidermiques. La fonction de « barrière biologique » cutanée recouvre des processus biochimiques se déroulant au sein des espaces intercornéocytaires et des processus immunitaires combinant des mécanismes de défense innée et adaptative.

Chez les vertébrés, les défenses innée et adaptative, agissent de manière synergique afin de combattre avec succès une infection ou une blessure (Figure 18). Le système inné est caractérisé par une réponse primaire et rapide capable de reconnaître des molécules associées aux agents microbiens, nommées *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMPs). Ces PAMPs sont reconnus par des récepteurs *Pathogen Recognizing Receptors* (PRRs) cytoplasmiques (*Nod-like receptors*, NLRs ; Fritz *et al.*, 2006 ; Franchi *et al.*, 2009) ou membranaires (*toll-like receptors*, TLRs ; Medzhitov *et al.*, 1997 ; Rock *et al.*, 1998). Les récepteurs TLR 1 à 6 et le TLR 9 sont exprimés dans les kératinocytes. Ce sont des glycoprotéines transmembranaires assurant un rôle essentiel dans l'immunité innée. En réponse à une invasion virale, bactérienne, fongique ou parasitaire, l'interaction entre les récepteurs TLRs et les PAMPs conduit à la production de peptides antimicrobiens (PAMs ; β -défensines, dermicidine, psoriasine, RNase7, cathélicidine) et de médiateurs de l'inflammation (cytokines : interleukines, IL ; chimiokines ; facteurs de croissance ; interférons , IFNs ; facteurs de nécrose tumorale, TNF). Les PAMs, en plus de leur action antimicrobienne directe, ont des propriétés chimiotactiques vis-à-vis des autres éléments de l'immunité innée, notamment les cellules

dendritiques ou les phagocytes, mais aussi vis-à-vis des cellules T (Yang *et al.*, 1999 ; Yang *et al.*, 2002). L'immunité adaptative est caractérisée par une réponse plus lente mais aussi la spécificité de reconnaissance et la mémoire. Bien que différents, ces deux systèmes collaborent étroitement.

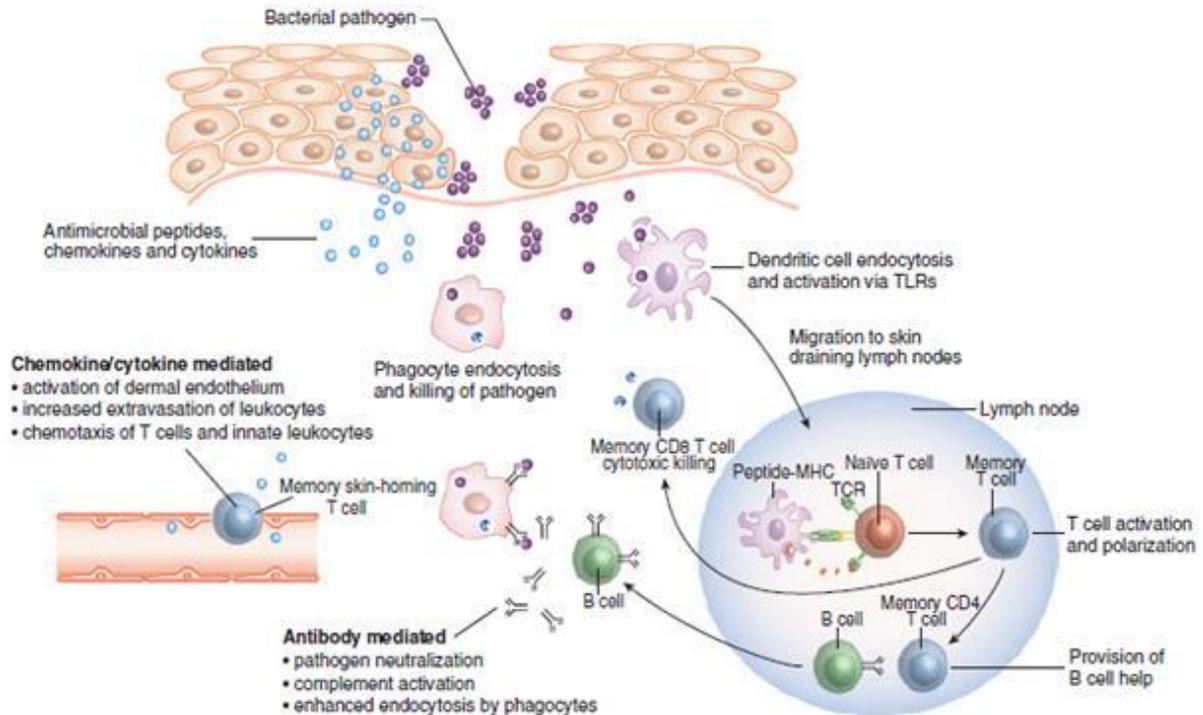


Figure 18: Interaction entre les immunités innée et adaptative en réponse à une infection bactérienne de la peau. Clarke et Kupper, 2005.

Lors d'une infection bactérienne, les kératinocytes produisent des PAMs, des chimiokines et des cytokines. Suite à cet événement, le tissu endothélial est activé, avec une migration des cellules T et des leucocytes dans la peau. Ces facteurs peuvent aussi activer les phagocytes ou stimuler la migration des cellules dendritiques vers les ganglions lymphatiques pour la présentation de l'antigène exogène. Au niveau des ganglions lymphatiques, les cellules T mémoire sont activées et peuvent se différencier en cellules T cytotoxiques CD8 qui migrent sur le site de l'inflammation. Elles peuvent aussi se différencier en cellules T helper CD4 responsables de l'activation des cellules B, en induisant la production d'anticorps.

5-2-3-3 Convergence des systèmes de défense innée animaux et végétaux

La fonction barrière de la peau implique en premier lieu des réactions de défense innée dont les mécanismes moléculaires sont comparables à ceux mis en place lors de la PTI chez les plantes. Chez les mammifères comme chez les plantes la réponse immune innée vise à limiter la progression du pathogène. Dans les deux systèmes, la reconnaissance des PAMPs par des récepteurs membranaires de type *LRRs* (*Leucine rich repeat receptors*) entraîne l'activation de la voie des MAP (*mitogen-associated protein*)-kinases, la production d'espèces réactives de l'oxygène, des flux de calcium, l'activation de facteurs de transcription et la production de PAMs (**Figure 19**). Ces similitudes peuvent s'expliquer par une évolution convergente des mécanismes de défense innée entre les organismes végétaux et animaux (Ausubel, 2005 ; Maekawa *et al.*, 2011). Basée sur ce constat de l'existence d'un parallélisme des mécanismes de défense innée chez les plantes et les animaux, l'idée d'explorer les effets de molécules élicitrices *in planta* de type DAMPs (polysaccharides pariétaux et fragments associés) sur la défense innée cutanée constitue une approche intéressante pour identifier de nouvelles molécules végétales aptes à renforcer les fonctions de barrière biologique de la peau. Les composés pectiques contenant des résidus rhamnose (chaînes pectiques RGI et RGII) pourraient ainsi être des molécules candidates. En effet, les résidus d' α -L-Rhamnose sont capables d'induire l'expression des gènes impliqués dans la synthèse du collagène chez les fibroblastes en culture

(Ravelojaona *et al.*, 2008). Par ailleurs, il a été montré que les protéoglycanes de la paroi, les AGPs peuvent faciliter la cicatrisation en induisant la prolifération des kératinocytes en culture (Zippel *et al.*, 2009). C'est dans ce contexte, que l'implication du laboratoire dans le projet SkinOFlor a été générée.

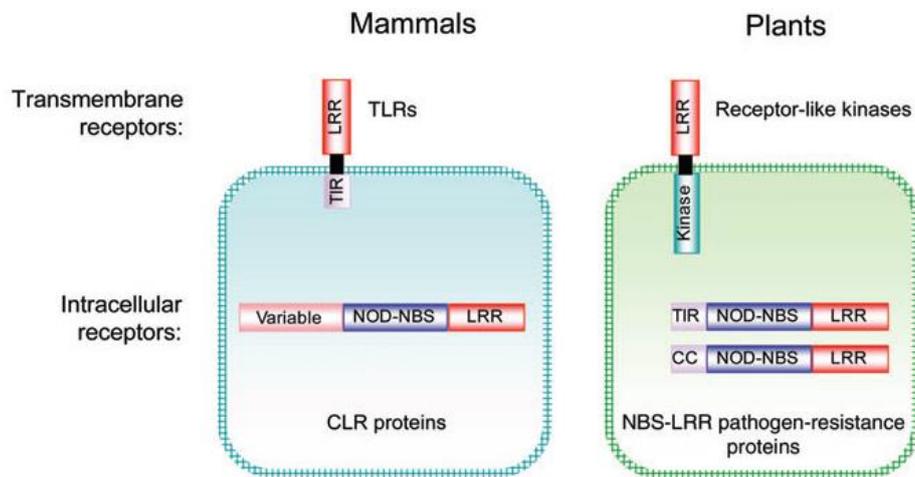


Figure 19: Récepteurs membranaires et intracellulaires impliqués dans la réponse immunitaire innée chez les mammifères et les plantes. Ausubel, 2005.

Les PAMPs sont reconnus par des récepteurs transmembranaires, les TLRs et les récepteurs doués d'activité kinases respectivement des cellules animales et végétales. Alors que les récepteurs intracellulaires des cellules de mammifères peuvent également interagir avec des PAMPs et/ou des DAMPs, les récepteurs intracellulaires des cellules végétales sont spécialisés dans la reconnaissance des facteurs de virulence produits par les agents microbiens lors de l'ETS.

CLR, CATERPILLER proteins (aussi appelées *Nod proteins*) ; CC, coiled-coil; ETS, Effector-triggered Susceptibility ; LRR, Leucine Rich Repeat ; NBS, nucleotide binding segment ; TIR, Toll-interleukin 1 (IL-1) receptor ; TLR, Toll-like receptor.

5-2-3-4 Impact de glycomolécules sur l'expression cutanée des gènes de défense innée en lien avec le microbiome

L'impact de biomolécules de nature polysaccharidique d'origine végétale (Rhamnogalacturonane II extrait de feuilles de tabac) ou issus de fermentation bactérienne (« Téfloze », polysaccharide anionique riche en rhamnose, glucose et acide glucuronique, produit par le laboratoire Bio-Europe), sur les fonctions barrières de la peau suite à l'exposition à trois germes bactériens a été exploré. Les bactéries cutanées ciblées dans ce projet sur la base de leur représentativité et de leur rôle clé au sein du microbiome cutané sont deux coques à Gram +, *Staphylococcus epidermidis* et *Staphylococcus aureus*, et un bacille à Gram -, *Pseudomonas fluorescens*.

Une analyse transcriptomique, au niveau des différentes couches épidermiques, des gènes liés à l'immunité innée a été réalisée. Cette étude, accomplie grâce à l'utilisation de la microdissection laser couplée à la PCR quantitative en temps réel (*quantitative Polymerase Chain Reaction*, qPCR) (Figure 20), a été réalisée à partir d'explants de peau humaine maintenus en survie et fournis par le laboratoire Bio-EC. Ces explants ont été exposés à l'un des trois germes bactériens présélectionnés par le laboratoire LMSM (*S. epidermidis*, *S. aureus* ou *P. fluorescens*). Nous avons également étudié à l'échelle subcellulaire les caractéristiques morphologiques de la peau. De plus, des analyses immunocytologiques des mécanismes de défense en lien avec l'exposition bactérienne, ont été conduites par microscopie optique à épifluorescence et par microscopie électronique à transmission (MET). Enfin, l'effet des glycomolécules sélectionnées sur l'expression des gènes codant les PAMs et les cytokines pro-inflammatoires a été examiné.

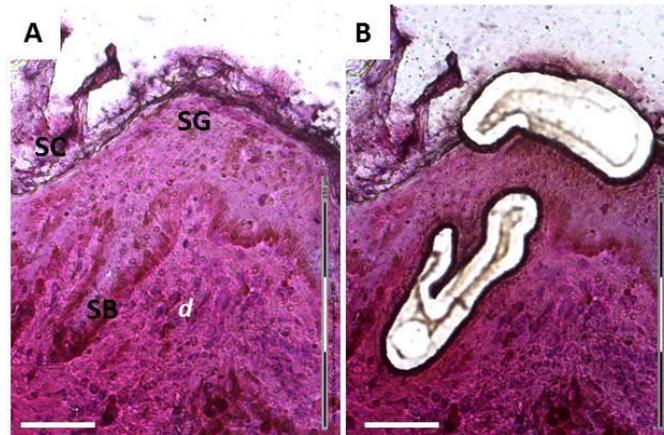


Figure 20 : Isolement par microdissection laser de fractions épidermiques enrichies en cellules des couches basale et granuleuse. Percoco *et al.*, 2012-ACL10.

Des coupes d'explants de peau fixés sont réalisées au cryostat et colorées par l'hématoxyline-éosine avant d'être traitées par microdissection laser. Coupe transversale d'explant de peau avant (A) et après (B) microdissection laser.

d, dermis; *SB*, stratum basale ; *SC*, stratum corneum; *SG*, stratum granulosum ; Barre d'échelle: 50 µm.

Les analyses par qPCR couplée à la microdissection laser ont permis d'établir des profils d'expression génique au sein des différentes couches de l'épiderme. Les gènes codant les protéines structurales intégrine- β 4/intégrine- α 6 et filaggrine-2/cornéodesmosine ont été choisis comme « marqueurs » des fractions enrichies respectivement en kératinocytes des couches basale et granuleuse. Dans les conditions témoins (sans exposition aux germes bactériens), nous avons montré que les niveaux de transcrits correspondant aux PAMs (psoriasine, bêta-défensines humaines hBD2 et hBD3, RNase7), aux récepteurs TLR2 et Nod1 sont significativement plus élevés au sein des couches les plus superficielles de la peau. Pour d'autres gènes codant pour les récepteurs TLR5 et Nod2, aucune différence d'expression au sein de l'épiderme n'a été observée. En présence des agents bactériens (déposés à la surface des explants maintenus en survie), les analyses microscopiques montrent l'absence de pénétration des bactéries dans la partie vivante de l'épiderme. Aucune bactérie n'est observée au-delà du *stratum corneum disjunctum*. Cependant, la présence des agents bactériens à la surface de l'épiderme, induit des altérations morphologiques au sein des kératinocytes de la couche basale (Figure 21A) et modifie l'expression des gènes de défense innée dans tout le tissu épidermique (Figure 21B). Alors que les gènes codant les PAMs hBD2 et hBD3 sont sur-exprimés dans les fractions épidermiques enrichies en kératinocytes du SG, l'expression des gènes codant les interleukines IL1 α/β et IL6 est augmentée dans les fractions épidermiques issues de la couche basale (Figure 21B). Récemment Lai *et al.* (2010) ont montré que *S. epidermidis* peut sécréter des molécules de faible masse moléculaire (inférieure à 10 kDa). Ces molécules, *via* leur interaction avec le récepteur TLR2, contribuent à renforcer l'expression des gènes codant pour les PAMs, notamment les β -défensines hBD2 et hBD3. Les données obtenues dans ce travail de thèse, suggèrent que de façon similaire à ce qui a été décrit pour *S. epidermidis*, *S. aureus* et *P. fluorescens* pourraient produire des molécules, de petite taille, capables de pénétrer vers la couche granuleuse où elles seraient reconnues par des récepteurs de types TLRs.

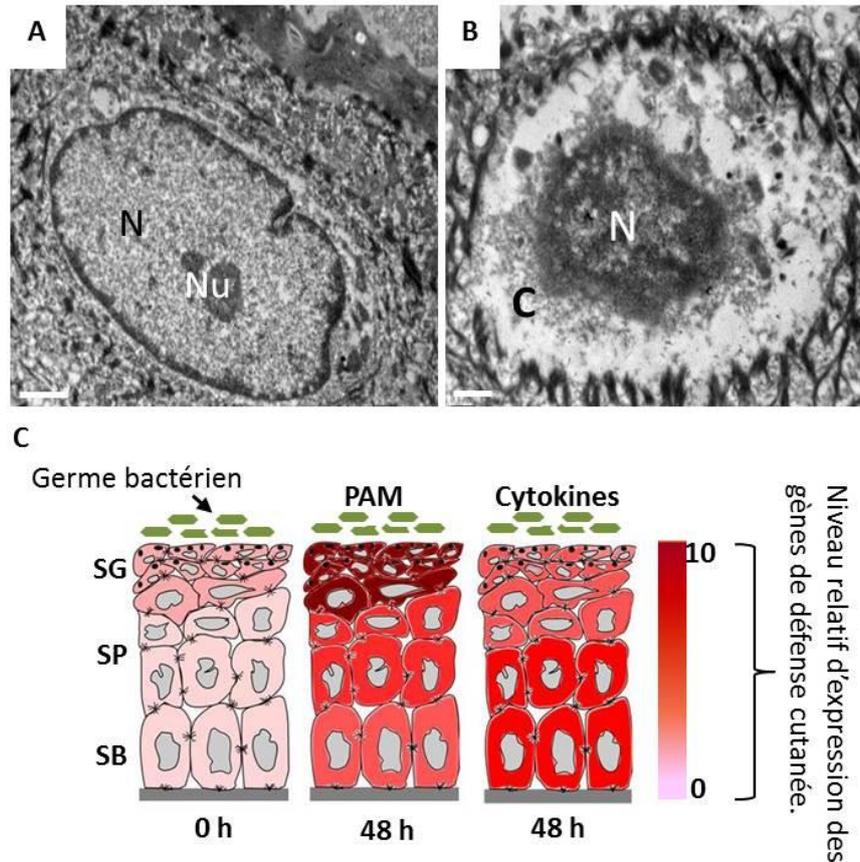


Figure 21 : Analyses morphologiques par microscopie électronique à transmission et profil d'expression des gènes de défense cutanée par qPCR couplée à la microdissection laser.

(A), Noyau intact au sein d'un kératinocyte de la couche basale. (B), noyau à chromatine condensée au sein d'une cellule du SB après 96 h de contact avec *S. epidermidis* (10^7 bacteries/cm²).

(C), Les agents bactériens (*S. epidermidis* ou *S. aureus* ou *P. fluorescens*) sont déposés à la surface d'explants de peau en survie (10^7 bacteries/cm²). Deux fractions épidermiques enrichies en kératinocytes des couches basale et granuleuse sont isolées par microdissection laser au moment de l'infection (0h) et 48 h après le contact bactérien. L'expression des gènes de défense cutanée de type inné au sein de ces deux fractions est ensuite analysée par q-PCR.

C, cytoplasme; N, noyau; Nu, nucléole. Barre d'échelle: A, 1 µm; B, 0.5 µm; SG, *stratum granulosum*; SP, *stratum spinosum*; SB, *stratum basale*.

Le traitement des explants par le polymère pectique RGII ne modifie pas les profils d'expression des gènes de défense étudiés. L'immunolocalisation d'épitopes associés à ce composé pectique montre que le RGII, bien que de faible masse moléculaire (environ 5 kDa), reste à la surface de l'explant. Ceci pourrait expliquer l'absence de modulation de l'expression génique. En perspective, il serait envisageable de prolonger le temps d'incubation de l'explant avec une solution aqueuse contenant du RGII afin de favoriser la pénétration de la glycomolécule vers l'épiderme vivant. De plus, le RGII n'altère pas la croissance des bactéries *S. epidermidis* et *S. aureus*. En revanche, une augmentation de l'expression des gènes codant pour les β -défensines hBD2 et hBD3 a été observée en traitant les explants avec des souches bactériennes de *S. epidermidis* et *P. fluorescens* pré-incubées avec du RGII à une concentration de 50 µg/mL. Ces résultats sont très similaires à ceux observés lors de la pré-incubation de ces germes avec le « Téflose » à une concentration de 0.01%. Ces pré-incubations pourraient avoir augmenté la production des PAMPs par les bactéries et par conséquent la réponse défensive des cellules cutanées. L'étude des propriétés d'adhésion des bactéries et de leur virulence en présence du RGII aiderait à la compréhension de ces observations.

L'ensemble de ces travaux de recherche a donné lieu à :

3 publications dans une revue à comité de lecture :

ACL10- Percoco *et al.* (2012). *Experimental Dermatology*. 21 : 531–534.

ACL14- Percoco *et al.* *Experimental Dermatology*. *In press*.

ACL15- Mijouin *et al.* *PLOS ONE*. *In press*.

2 articles de vulgarisation :

-Follet-Gueye *et al.* (2011). « Cryomicroscopie : un autre regard sur la vie cellulaire ». Communiqué Focus Recherche *Cosmetic Valley*, n°7, Janv-Févr2011.

-Follet-Gueye *et al.* (2013). « La microdissection laser de la peau : un nouvel outil d'objectivation dermocosmétique ». Communiqué Focus Recherche *Cosmetic Valley*, *in press*.

6 – Projet de recherche

Les recherches du laboratoire GlycoMEV s'orientent actuellement vers deux axes : 1-« **la santé des plantes** » (**stimulation de l'immunité végétale** pour l'amélioration des stratégies de défense des plantes) et 2-« **la santé humaine** » (production de protéines thérapeutiques dans des organismes végétaux et applications dermocosmétiques de glycomolécules végétales).

Ainsi, s'appuyant sur de solides compétences scientifiques et techniques concernant la caractérisation structurale et fonctionnelle **des glycomolécules végétales** de la matrice extracellulaire, un des objectifs des recherches menées au laboratoire vise à mieux cerner leurs **effets biologiques** et **leur mécanisme d'action**.

Les deux axes principaux de recherche que je souhaite développer, en collaboration avec les autres membres du laboratoire impliqués dans ces thématiques, s'intègrent dans cette perspective et consisteront à :

1-Evaluer l'impact des polysaccharides et protéoglycanes pariétaux et plus particulièrement **des Arabinogalactanes protéines (AGPs)** lors des **interactions plante(s)-microorganisme(s) au sein de la rhizosphère**.

2-Déterminer les effets de peptides et glycopéptides végétaux, dont les AGPs, dans le renforcement **de la barrière cutanée**.

6-1 Glycomolécules pariétales et signalisation

La matrice extracellulaire végétale, riche en polysaccharides, glycoprotéines et protéoglycanes (cf. § 5-2-1-2), représente une source considérable de biomolécules. Depuis très longtemps, les composés pariétaux sont utilisés en tant que matière première dans l'industrie textile et papetière, du bois de construction, des agents texturants, etc... . Plus récemment, de nombreuses recherches centrées sur la valorisation des constituants pariétaux dans l'industrie des biocarburants ont été menées (Gomez *et al.*, 2008 ; Vanholme *et al.*, 2012).

Lors du développement des végétaux, il est admis que la paroi cellulaire contrôle les processus de croissance et de différenciation (Cosgrove, 2005) et assure également une fonction de protection vis-à-vis des stress environnementaux (Nüsche, 2012). Outre l'action purement mécanique ou physique des composants pariétaux, ces derniers peuvent agir en tant que signaux moléculaires *in planta* ou dans l'environnement biotique proche.

6-1-1 Les oligogalacturonides (OGs)

Les composés pectiques et plus spécifiquement les homogalacturonanes constituent la catégorie de molécules pariétales dont les fonctions de signalisation ont été clairement démontrées. Dès 1981, Hahn *et al.*, montrent l'effet éliciteur d'extraits pectiques enrichis en homogalacturonanes (HG) se traduisant par l'accumulation de phytoalexines chez le soja. Ces extraits contiennent des fragments d'HG de degré de polymérisation compris entre 10 et 15 unités d'acide galacturonique, les oligogalacturonides (OGs), considérés comme des éliciteurs endogènes ou DAMPs (*Damage-Associated Molecular Patterns*). Lors d'attaques de pathogènes, les OGs sont libérés après dégradation des HG par des polygalacturonases microbiennes (Cervone *et al.*, 1989) ou endogènes

(Orozco-Cardenas and Ryan, 1999) et stimulent alors la défense chez de nombreuses plantes (Aziz *et al.*, 2004 ; Ferrari *et al.*, 2007). Comme les éliciteurs microbiens (MAMPs et PAMPs), les OGs induisent la production de ROS et des dépôts pariétaux de callose (Galletti *et al.*, 2008) ainsi que l'expression de gènes de défense *via* l'activation de MAPKs (Galletti *et al.*, 2011 ; Ferrari *et al.*, 2013). Par ailleurs, en l'absence d'attaques par des agents pathogènes, les OGs sont également produits par des polygalacturonases endogènes, et contrôlent la croissance cellulaire. Les OGs sont alors décrits comme des molécules antagonistes des auxines (Branca *et al.* 1988 ; Spiro *et al.*, 2002 ; Savatin *et al.*, 2011). Des protéines de la membrane plasmique initialement identifiées pour leur capacité à lier les acides polygalacturoniques appelés *Wall-associated kinases* (WAKs) (Anderson *et al.*, 2001; Decreux and Messiaen, 2005), ont été préssenties comme des récepteurs des OGs. Le génome d'*Arabidopsis* comporte 5 gènes codant des protéines WAKs (*WAK1-5 genes*) et 22 gènes codant des protéines apparentées aux WAKs (*WAKL, Wall associated-like genes*) (Verica *et al.*, 2003). Ces protéines possèdent un segment Nt extracellulaire et un segment Ct cytosolique à activité kinase. La protéine AtWAK1 a été caractérisée comme le récepteur d'OGs impliqué dans l'immunité végétale induite lors d'attaque par des phytopathogènes (Decreux and Messiaen, 2005 ; Ferrari *et al.*, 2013).

6-1-2 Les arabinogalactanes protéines (AGPs)

Chez les végétaux, les arabinogalactanes protéines (AGPs) sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques en relation avec la croissance, le développement et la différenciation (Gao et Showalter, 2000 ; Mollet *et al.*, 2002 ; Seifert and Roberts, 2007 ; Nguema-Ona *et al.*, 2012). Bien que les mécanismes cellulaires d'action des AGPs ne soient pas aussi bien caractérisés que ceux des fragments pectiques OGs, les AGPs sont indéniablement des molécules pariétales à activité biologique importante. Depuis plus de 10 ans, tout d'abord au sein de l'équipe « Polysaccharides et AGPs » créée par le Pr A. Driouich (Laboratoire Glycobiologie et Transport chez les végétaux, UMR 6037), puis actuellement au sein du laboratoire GlycoMEV, nous travaillons sur les analyses structurale et fonctionnelle des AGPs.

6-1-2-1 Structure moléculaire des AGPs

Les AGPs sont des protéoglycanes de la famille des HRGPs à structure glycanique complexe représentant 90 à 98 % de leur masse moléculaire (**Figure 22**). La composition osidique des glycanes varie suivant les AGPs, les organes végétaux ou les espèces considérées. Les AGPs sont principalement O-glycosylées et la partie glycanique est le plus souvent liée à la partie protéique *via* des résidus hydroxyproline par des arabinogalactanes de type II. Ces chaînes sont constituées de résidus β -(1,3)-galactane et β -(1,6)-galactane substituées par des résidus arabinose. Il existe une très grande variabilité dans la composition des chaînes glycaniques pouvant également contenir d'autres monosaccharides comme l'acide glucuronique, le D-fucose, le L-rhamnose ou le D-xylose. Les AGPs peuvent également être N-glycosylées sur des résidus asparagine. La partie protéique qui représente uniquement 2 à 10 % de la masse des AGPs, est riche en résidus hydroxyproline (Hyp)/proline (Pro), alanine (Ala), sérine (Ser) et thréonine (Thr) avec des unités répétitives Ala-Hyp, Ser-Hyp, Thr-Hyp, Val-Pro, Gly-Pro ou Thr-Pro. Il existe une très grande diversité du squelette protéique. Schultz *et al.* (2000 ; 2002) ont proposé une classification des AGPs par approche bioinformatique reposant sur leur structure protéique. Les AGPs classiques sont constituées d'une partie protéique d'environ 100 acides aminés. Elles sont essentiellement O-glycosylées sur un résidu hydroxyproline, ou sérine ou thréonine et présentent des domaines riches en proline- hydroxyproline. Les AG peptides, constituent une population d'AGPs à très courte chaîne protéique formée par l'enchaînement de 58 à 87 acides aminés. Il existe également des AGPs dites chimériques qui possèdent, en plus de leur domaine Pro/Hyp d'autres domaines. Il s'agit par exemple des AGPs riches en lysine, ou encore les AGPs de type FLA (*fasciclin-like* AGPs) possédant un ou plusieurs domaines

fasciclins (Johnson *et al.*, 2003). Les AGPs chimériques (encore appelés AGPs non classiques) peuvent présenter des domaines riches en lysine et cystéine et sont plus fréquemment N-glycosylées (Schultz *et al.* 2000 ; 2002 ; Johnson *et al.* 2003 ; Ellis *et al.*, 2010). La présence d'une ancre GPI (glycosylphosphatidylinositol) sur l'extrémité N-terminale de la partie protéique est prédite pour une grande partie des AGPs permettant de fixer les AGPs à la membrane plasmique (Figure 22).

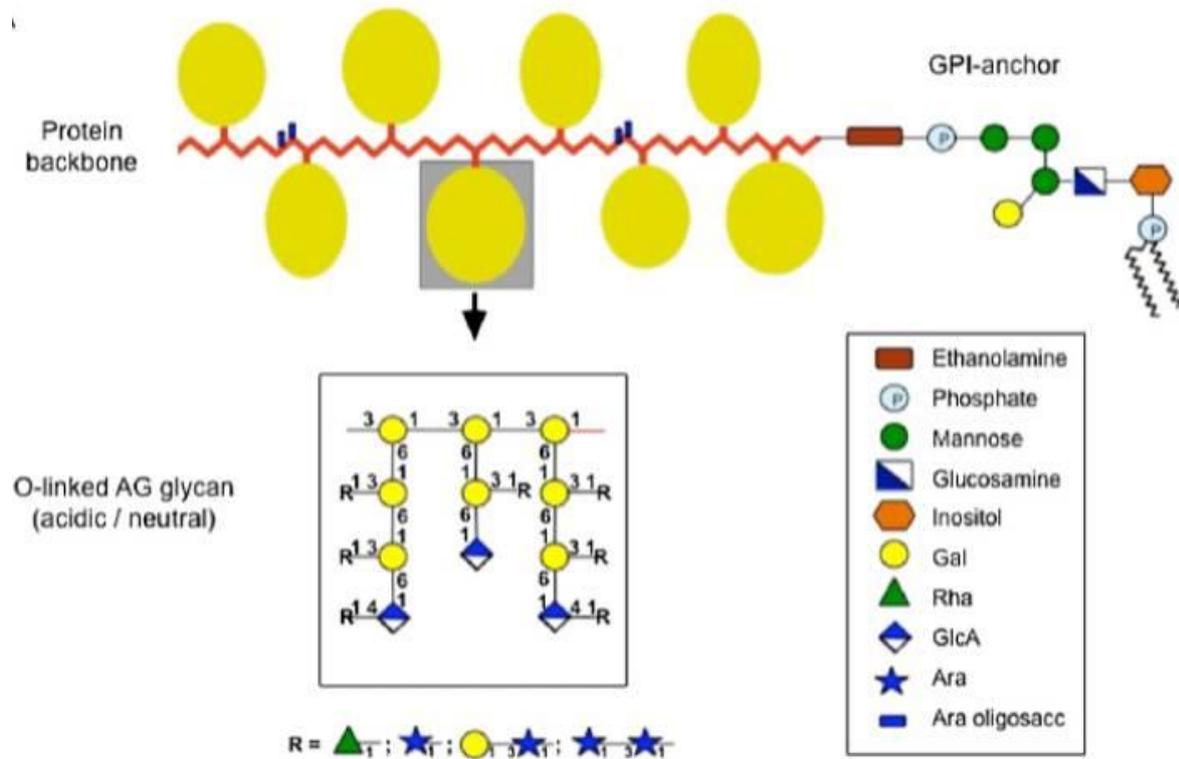


Figure 22 : Structure des Arabinogalactanes protéines, AGPs. Ellis *et al.*, 2010.

Structure d'une arabinogalactane protéine constituée d'une partie protéique et de parties glycaniques. La structure présentée possède une ancre GPI sur l'extrémité C-terminale de la partie protéique.

6-1-2-2 AGPs et signalisation

Outre les approches de génétiques fonctionnelles et de biologie moléculaire, des outils spécifiques ont été développés afin d'étudier les fonctions biologiques des AGPs tels les sondes immunologiques (anticorps polyclonaux ou monoclonaux, Nguema-Ona *et al.*, 2012) et le réactif β -glucosylphenylazo (1,3,5-tris [4- β -D-glucopyranosyloxyphenylazo]-2,4,6-trihydroxy benzène), plus connu sous le nom de réactif de Yariv. Le Yariv est un colorant rouge-brun liant et/ou précipitant les AGPs (Yariv *et al.*, 1967 ; Kitazawa *et al.*, 2013). Ce réactif est utilisé pour purifier les AGPs après précipitation ou pour perturber *in vivo* l'organisation des AGPs et observer l'effet induit sur la plante.

Les AGPs sont détectées dans tous les types cellulaires où elles sont localisées essentiellement au niveau de la membrane plasmique et de la paroi cellulaire végétale. Elles sont également présentes dans les milieux extracellulaires (milieux de culture de lignées cellulaires en suspension, exsudats racinaires...). Leurs fonctions biologiques sont très diverses (Seifert and Roberts, 2007). Plusieurs études réalisées sur des suspensions cellulaires végétales en culture *in vitro* montrent qu'elles participent au contrôle des divisions cellulaires et du processus de mort cellulaire programmée (Serpe *et al.*, 1994 ; Gao et Showalter 1999 ; Guan et Nothnagel, 2004). Les AGPs sont également impliquées dans l'embryogenèse et la morphogénèse (Seifert and Roberts, 2007). Par exemple, leurs

rôles dans l'expansion cellulaire (Andème-Onzighi *et al.*, 2002 ; Nguema-Ona *et al.*, 2007), la croissance du tube pollinique (Nguema-Ona *et al.*, 2012), ou l'épaississement secondaire des parois ont été bien documentés (Dahiya *et al.*, 2006).

L'implication des AGPs dans les interactions plante-microorganismes (pathogènes ou bénéfiques) est de plus en plus étudiée et intéresse tout particulièrement le laboratoire GlycoMEV (Nguema-Ona *et al.*, 2013 ; **Figure 23**). Viché *et al.*, (2005) ont montré que la perturbation des AGPs associées aux BLCs d'*Arabidopsis* inhibe l'adhésion des bactéries *Rhizobium* au système racinaire. Un travail similaire a récemment été publié par Xie *et al.* (2012). Chez la plante modèle *Arabidopsis*, l'infection des racines par la rhizobactérie *Agrobacterium tumefaciens*, est réduite pour les plantules sauvages préalablement traitées par le réactif de Yariv. Le même phénomène est observé chez les mutants *rat1* dont le gène codant pour l'AGP17 est affecté (Gaspar *et al.*, 2004). Récemment, des travaux menés au laboratoire GlycoMEV sur le pathosystème Pois/*Aphanomyces euteiches* révèlent que les AGPs produites par les racines de pois favorisent l'enkystement de l'oomycète et inhibent sa germination, bloquant ainsi son cycle de développement (Cannesan *et al.*, 2012-**ACL12**).

Alors que les fonctions biologiques des AGPs sont multiples et bien renseignées, leurs mécanismes de signalisation cellulaire demeurent très mal connus. Les AGPs peuvent être une source considérable de molécules « signal » essentiellement de nature oligosaccharidique. Ainsi les AGPs à ancre GPI peuvent être clivées par des phospholipases spécifiques, puis des fragments osidiques peuvent être libérés par des endoglucanases spécifiques endogènes ou d'origine microbienne et induire une réponse cellulaire *via* l'interaction avec un récepteur (Showalter, 2001 ; Nguema-Ona *et al.*, 2013 ; **Figure 23**). Cependant à ce jour aucun *receptor like* kinase (RLK) ou autres récepteurs de type protéines WAKs/WAKLs n'a été identifié comme liant les AGPs ou leurs fragments. Seifert et Roberts (2007) émettent également l'idée intéressante selon laquelle les AGPs pourraient être des co-récepteurs se basant notamment sur le fait que des analyses d'immunofluorescence montrent une co-localisation de certaines WAKs et des épitopes associés aux AGPs (Gens *et al.*, 2000).

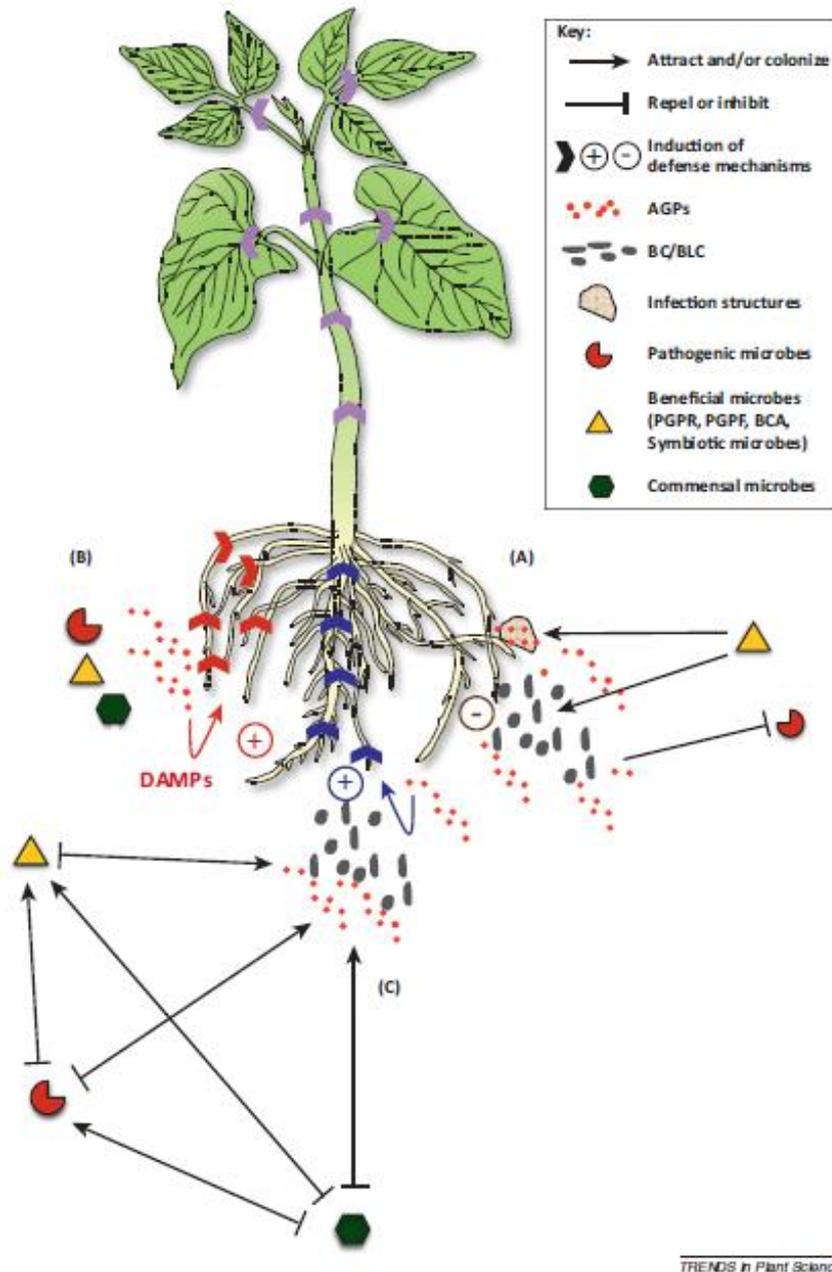


Figure 23 : Représentation des rôles possibles des AGPs lors de l'interaction racine / microorganismes. Nguema Ona et al., 2013.

(A) Les AGPs sont capables d'attirer des agents microbiens symbiotiques (bactéries et champignons) qui vont infecter les racines et développer des structures d'infection. Elles sont abondamment présentes sur les cellules des racines et les structures infectieuses microbiennes où elles pourraient contrôler la formation de ces structures et la prolifération des microorganismes ou inhiber leur développement. (B) Les microorganismes du sol sont capables de dégrader les AGPs, ce qui pourrait libérer des DAMPs (*Damage-Associated Molecular Patterns*) et activer les mécanismes de défense des plantes (flèches rouges). (C) Les AGPs sécrétées peuvent également favoriser la colonisation de la rhizosphère par des microorganismes bénéfiques qui sont capables d'activer les réactions de défense des plantes telle que la résistance systémique induite (flèches bleues), ou d'inhiber les microorganismes pathogènes et ainsi supprimer une maladie. Les flèches grises indiquent une induction possible et/ou la modulation des mécanismes de défense dans les parties aériennes de la plante, comme une conséquence de l'activation des mécanismes de défense par les produits de dégradation des AGPs (B) ou par des microbes bénéfiques (C).

AGPs, arabinogalactan proteins ; BCA, biocontrol agent ; PGPR, plant growth-promoting rhizoacteria ; PGPF, plant growth-promoting fungi.

En Septembre 2012, le Pr Azeddine Driouich et le Dr Eric Nguema-Ona ont élaboré un projet de recherche centré sur la construction d'une banque d'AGPs issues de plantes d'origines très diverses (plantes de grandes culture, plantes endémiques d'Inde et d'Afrique) dont l'aboutissement sera le développement de nouveaux biopesticides. Pour la réalisation de ce projet (projet NéoSDN financé par la région de Haute Normandie), le Dr Eric Nguema-Ona, post-doctorant au laboratoire, optimise les outils biochimiques d'extraction et de caractérisation de ces glycomolécules.

Dans ce contexte, les deux axes de recherche (**tableau 6**) que je souhaite développer s'associent à d'autres programmes menés au laboratoire et contribueront à :

1- Caractériser les interactions entre les cellules frontières produites par les racines, et les microorganismes de la rhizosphère (pathogènes ou bénéfiques).

Un accent particulier sera mis sur l'étude du degré **d'implication des arabinogalactanes protéines (AGPs)** dans ces interactions. Ce travail se déroulera en étroite collaboration interne avec le Dr Maïté Vicro-Gibouin, qui a initié et dirige actuellement au laboratoire, les travaux de mise en évidence de l'implication des BLC dans la défense des plantes vis-à-vis de pathogènes (axe 2, **tableau 2**). De plus, cet axe de recherche sera réalisé *via* des collaborations externes avec les Dr Deborah Goffner (Laboratoire Environnement, Santé, Sociétés, Marseille), Geneviève Grundmann (Laboratoire d'Ecologie Microbienne, Université Claude Bernard Lyon I) et Christophe Gangneux du laboratoire Agri'Terr (Esitpa).

2- Déterminer les effets de peptides et glycopéptides végétaux, dont les AGPs dans le renforcement de la barrière cutanée.

Ce volet se situe dans la continuité des travaux initiés lors de la thèse du Dr G. Percoco. Ils seront réalisés en collaboration avec les Dr Florent Yvergnaux et Dr Thibaut Saguet (Entreprise Bio-Europe, groupe Solabia), Dr Elian Lati (Entreprise Bio-EC), et le Dr Michel Simon (UMR 5165, CNRS, Université Toulouse III).

Tableau 6 : Doctorats et post-doctorat liés au projet de recherche présenté dans ce manuscrit.

Santé des plantes	Déterminisme biotique de l'émergence de la pourriture racinaire du pois et impact d'agents de bio-contrôle	Doctorat, A partir de 10-2013 <i>GRR VASI</i>	Dr C. Gangneux (50%) Dr ML. Follet-Gueye (50%) <i>Agri'Terr, Esitpa Rouen GlycoMEV, Univ. Rouen</i>
	Interactions biotiques au sein de la rhizosphère de <i>Balanites aegyptiaca</i> , essence ligneuse de la Grande Muraille Verte (GMV)	Doctorat, A partir de 10-2013 <i>LABEX DRIIHM</i>	Dr D. Goffner (50%) Dr ML. Follet-Gueye (50%) <i>UMI 3189 CNRS, Marseille GlycoMEV, Univ. Rouen</i>
Santé humaine : Dermocosmétique	Effet de peptides et glycopeptides végétaux sur la barrière cutanée	Post-doctorat, A. Zahid 06-2013 / 12-2014 <i>Interreg IV, PeReNE</i>	Pr A. Driouich (50%) Dr ML. Follet-Gueye (50%) <i>GlycoMEV, Univ. Rouen</i>
		Doctorat, <i>Contrat CIFRE en cours de montage Bio-Europe, Groupe Solabia</i>	Pr A. Driouich (50%) Dr ML. Follet-Gueye (50%) <i>GlycoMEV, Univ. Rouen</i>

6-2 Interactions biotiques au sein de la rhizosphère

La **rhizosphère** se définit comme la portion du sol sous l'influence du système racinaire de la plante et/ou des éléments moléculaires produits par la plante (Bais *et al.*, 2006). Cet espace comprend le sol directement au contact des racines et s'étendant à quelques millimètres de la surface racinaire. Les **cellules frontières** qui se détachent de l'apex racinaire (*Border cells*, BCs ou *Border-Like Cells*, BLCs) sont des composants biotiques de la rhizosphère d'origine végétale auxquels s'ajoutent essentiellement des **microorganismes telluriques**.

6-2-1 Le microbiome rhizosphérique

Le nombre de microorganismes présents dans la rhizosphère est estimé à 10^{11} par gramme de sol réparti sur plus de 30.000 espèces procaryotes. Parmi ces microorganismes se distinguent des agents microbiens commensaux, phytopathogènes et bénéfiques pour le développement des plantes (Berendsen *et al.*, 2012 ; **Figure 24**). La grande majorité des microorganismes du sol (microorganismes commensaux) n'interagit pas directement avec la plante, mais de par l'impact qu'elle a sur les autres microorganismes telluriques, influence sensiblement le développement du végétal. Les microorganismes pathogènes peuvent être des bactéries, des champignons, des oomycètes ou encore des virus, parmi lesquels sont décrits les agents biotrophes, nécrotrophes et hémibiotrophes. Les mécanismes moléculaires contrôlant l'interaction entre les pathogènes et la plante hôte ont déjà été mentionnés dans ce manuscrit (cf. § 5-2-2-2).

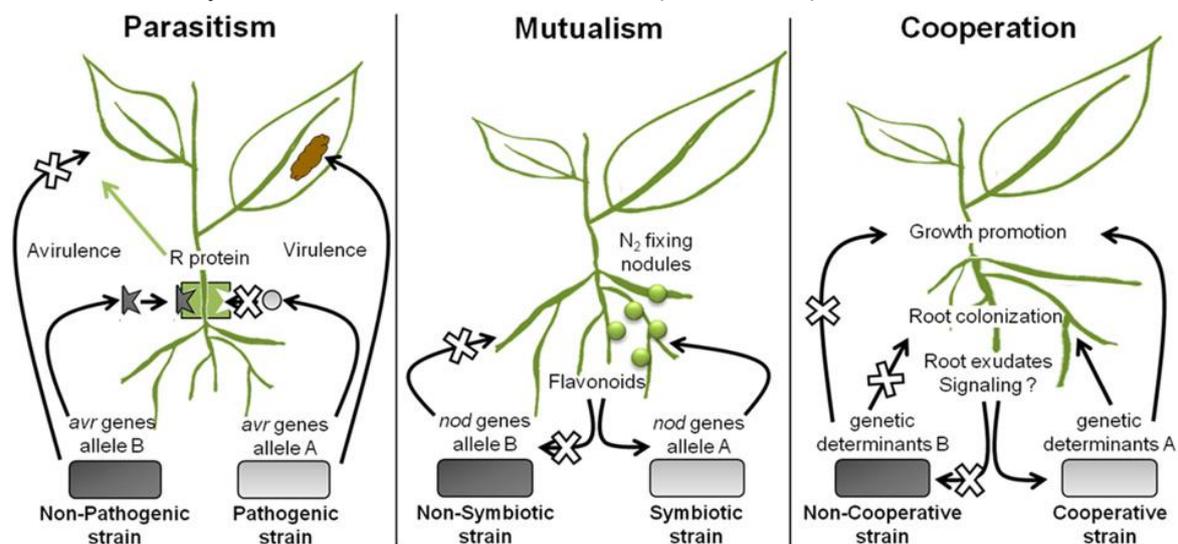


Figure 24 : Diversité des interactions plante(s)/microorganisme(s). Drogue *et al.*, 2012.

Dans les interactions parasitaires (*parasitism*) l'hôte reconnaît les effecteurs bactériens ou facteurs d'avirulence (étoile gris foncé) via des protéines de défenses spécifiques (*Resistant protein*, *R protein*). L'interaction mutualiste est schématisée ici pour une légumineuse et une bactérie fixatrice d'azote. La légumineuse produit des flavonoïdes dans la rhizosphère qui augmentent la production des facteurs bactériens de nodulation (*Nod factors*). Les facteurs Nod interagissent avec les récepteurs spécifiques de l'hôte et induisent alors la formation des nodosités (cercles verts). L'interaction de type coopération correspond aux agents microbiens bénéfiques de type PGPR. Ce dernier type d'interaction, pour lequel les mécanismes moléculaires font actuellement l'objet de nombreux travaux, impliquent souvent une reconnaissance de l'hôte et/ou la colonisation du système racinaire par les PGPRs.

Les agents microbiens bénéfiques sont les champignons mycorhiziens, les bactéries fixatrices d'azote aussi appelées microorganismes mutualistes, ainsi qu'un grand nombre d'autres champignons (*Plant growth-promoting fungus*, PGPFs) et de bactéries (*Plant growth-promoting rhizobacteria*, PGPRs). Les agents microbiens mutualistes interagissent avec un nombre restreint de plantes hôtes. Ils émettent

des signaux spécifiques les *Symbiots-Associated Molecular Patterns* (SAMPs), et n'activent généralement pas l'immunité végétale. Les autres microorganismes bénéfiques (PGPFs et PGPRs) ne présentent pas une spécificité d'hôte aussi étroite. L'effet positif des PGPRs est de plus en plus étudié. Il peut être direct ou indirect, et peut s'exercer sur différents aspects du développement de la plante tels que la nutrition, la croissance (*via* la production de régulateurs de croissance), ou la défense (Lugtenberg et Kamilova, 2009 ; Vacheron *et al.*, 2013). Ainsi les PGPRs peuvent être bénéfiques lors d'attaque d'agents pathogènes soit en produisant des agents antimicrobiens délétères au pathogène ou en renforçant l'immunité végétale. Les mécanismes d'action des PGPRs sont actuellement l'objet de nombreuses recherches du fait de leurs possibles utilisations en agriculture notamment en tant que biofertilisants et biopesticides (Walters *et al.*, 2013). Les interactions PGPRs-plante dépendent de nombreux paramètres incluant par exemple le génotype et le stade de développement de la plante hôte, la nature des exsudats racinaires, l'environnement microbien au sein de la rhizosphère mais également les propriétés du sol (teneurs en éléments minéraux, niveau d'irrigation etc...).

6-2-2 Cellules frontières et exsudats racinaires : mise en place d'un Piège Extracellulaire de Racine (PER) ou *Root Extracellular Trap* (RET)

Les interactions plante-microorganisme ont une incidence majeure sur la santé et le développement des plantes. L'apex racinaire est une région de la racine très importante dont la survie est cruciale pour le bon développement de la racine et donc de la plante. Comme précédemment décrit au § 5-2-2-1, la coiffe racinaire produit 2 types de cellules appelées cellules frontières: des BCs très souvent empaquetées dans un mucilage plus ou moins dense et des BLCs qui produisent généralement moins de mucilage (Driouich *et al.*, 2012 – **OS03**). Les cellules frontières, régulièrement libérées, demeurent vivantes au sein de la rhizosphère. Elles sont donc des acteurs rhizosphériques cruciaux contrôlant les interactions biotiques notamment par la production et la sécrétion au sein du mucilage de diverses molécules.

Les éléments moléculaires de la rhizosphère sont produits conjointement par la plante et les agents microbiens du sol. Les **exsudats racinaires** sont souvent scindés en deux classes de composés : les composés de bas poids moléculaire (acides aminés, acides organiques, oligosaccharides, composés phénoliques et autres métabolites secondaires) et les composés de haut poids moléculaire (**polysaccharides** et **protéoglycanes**). Alors que les premiers ont été abondamment décrits (Bais *et al.*, 2006), les études concernant les composés de haut poids moléculaires sont moins nombreuses. Les cellules frontières de racine sécrètent un mucilage plus ou moins abondant (Wen *et al.*, 2007 ; Durand *et al.*, 2009-**ACL07**) riche en glycomolécules pariétales notamment des pectines et des AGPs et également en protéines à activités anti-microbienne et en exDNA (*extracellular DNA* ou ADN extracellulaire) (Wen *et al.*, 2009). Comme cela a été bien caractérisé chez certaines cellules de mammifères, les polynucléaires neutrophiles, les cellules bordantes sont capables de sécréter de l'ADN dans le milieu extracellulaire, qui en s'associant aux protéines anti-microbiennes et aux autres éléments du milieu, constitue un piège vis-à-vis d'agents microbiens pathogènes (Brinkmann *et al.*, 2004 , 2010 ; Hawes *et al.*, 2011 ; Curlango-Rivera *et al.*, 2013). **Cet ensemble cellules frontières et mucilage** associé s'avère donc être un site privilégié d'interaction entre la plante et les microorganismes telluriques qui seront tantôt repoussés ou attirés puis piégés dans ce ciment rhizosphérique que nous avons récemment baptisé **Piège Extracellulaire de Racine (PER)** ou ***Root Extracellular Trap* (RET)** (Driouich *et al.*, 2013 ; **Figure 25**).

Les AGPs issues des cellules frontières (Vicré *et al.*, 2005 ; Cannesan *et al.*, 2012-**ACL12**) et présentes au sein du RET (Durand *et al.*, 2009-**ACL07** ; Cannesan *et al.*, 2012-**ACL12**), peuvent participer de par leurs propriétés d'adhésion au maintien de l'intégrité du RET. De plus, comme mentionné plus haut (**§ 6-1-2-2**), plusieurs études révèlent leur implication dans les interactions plantes-microorganismes

(Nguema-Ona *et al.*, 2013; **Figure 23**). Tandis que l'influence du RET lors de l'attraction de zoospores a été décrite chez le pathosystème coton-*Pythium dissotocum* (Curlongo-Rivera et Hawes, 2011), l'implication directe des AGPs dans l'attraction et l'enkystement des zoospores chez le pathosystème pois-*Aphanomyces euteiches* a également été montrée (Cannesan *et al.*, 2012-**ACL12**). Une étude récente (Beauregard *et al.*, 2013) révèle que des polymères végétaux comprenant des arabinogalactanes, des pectines et des xylanes peuvent favoriser la prolifération d'une bactérie bénéfique, *Bacillus subtilis*, au sein de la rhizosphère.

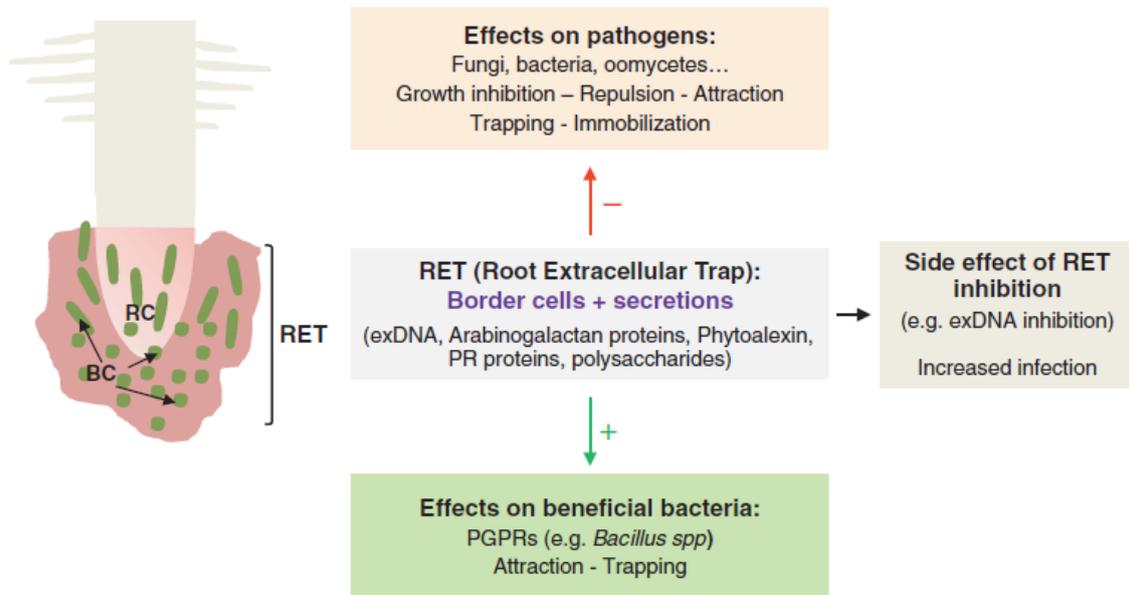


Figure 25 : Modèle de fonctionnement du piège extracellulaire de racine (PER) ou Root Extracellular Trap (RET). *Driouich et al.*, 2013-**ACL13**.

Le RET est formé par les cellules frontières et le mucilage associé. Le RET contient diverses molécules (protéines anti-microbiennes, AGPs, ADN extracellulaire, etc...) synthétisées et sécrétée par les cellules frontières. Plusieurs travaux montrent la capacité du RET à modifier les interactions plante(s)-microorganisme(s) et à participer ainsi à la protection de la plante. Lorsque la formation du RET est expérimentalement inhibée, de sévères symptômes infectieux sont observés.

BCs, Border Cells; ExDNA, Extracellular DNA; PRs, Pathogenesis-Related Proteins; PGPR, Plant Growth-Promoting Rhizobacteria; RC, Root Cap.

6-2-3 Interactions biotiques au sein de la rhizosphère de *Balanites aegyptiaca*, essence ligneuse de la Grande Muraille Verte (GMV)

6-2-3-1 Contexte de l'étude

Depuis Janvier 2012, j'ai engagé une collaboration scientifique avec le Dr D. Goffner, directeur de recherche CNRS, UMI 3189, Marseille (laboratoire Environnement, Santé, Sociétés) qui travaille au sein de l'observatoire Hommes-Milieus Tésékéré, Sénégal. Les Observatoires Hommes-Milieus (OHM) se consacrent à l'étude de socio-écosystèmes fortement impactés par l'homme sur les plans écologique, économique et social. L'OHM Tésékéré se situe dans le Ferlo, région du Nord du Sénégal et étudie le système socio-écologique qui entoure la mise en place du projet panafricain de la grande muraille verte (GMV). Dans ce cadre, nous avons commencé à caractériser les cellules frontières de plusieurs espèces d'arbres de cette zone. En Juin 2013, nous avons répondu à un appel à projet pour contrat doctoral LABEX Dispositif de Recherche Interdisciplinaire sur les Interactions Hommes-Milieus (DRIIHM). Notre projet de thèse a été retenu (**annexe 02**). Cependant, ce projet jeune et

ambitieux ne bénéficie pour l'instant d'aucun autre apport financier notamment pour assurer son fonctionnement. Nous envisageons donc de répondre dès cette année aux appels à projets des OHM pour obtenir un apport initial. De plus, il sera impératif, dès la seconde année de notre étude, de faire une demande auprès d'autres sources de financement de projets (programme SudExpert Plants, ANR etc...).

Je serai co-directrice de cette thèse avec le Dr D. Goffner. Le contenu de l'appel à projet déposé en Juin 2013 est intégralement restitué en **annexe 02**.

6-2-3-2 Etapes prévisionnelles et déroulement du projet au laboratoire

Le dattier du désert (*Balanites aegyptiaca*) est un arbre adapté aux milieux semi-arides qui est connu pour sa grande résistance à la sécheresse. C'est l'une des espèces ligneuses choisie pour le reboisement dans le programme GMV. De plus, les premières étapes de reboisement sur site, montrent que c'est l'une des essences qui survit le mieux à la réimplantation. Etant donnée la pauvreté du sol sur les sites de reboisement, évaluer l'impact de l'implantation du dattier du désert, notamment sur la microflore tellurique aidera à comprendre les modifications participant à la « restructuration » des sols.

Dans ce contexte, les objectifs principaux de cette thèse seront **1-** d'explorer de façon détaillée le fonctionnement de l'apex racinaire chez cette espèce, et **2-** de déterminer l'impact de l'implantation de ce ligneux sur la diversité microbienne du sol rhizosphérique, et cela, dès les premiers stades du développement de la plante.

Le dattier du désert produit des fruits charnus de type drupacé de 1 à 2,5 cm de long, de forme ovale et de couleur verdâtre-blanchâtre, qui contiennent une seule graine. La fructification a lieu de Juillet à Octobre. Le laboratoire est régulièrement approvisionné en noyaux de dattier du désert par l'OHM Tésékéré. Toutes les expériences seront réalisées soit en conditions de cultures hydroponiques (**étape 1**) soit en conditions de cultures en microcosmes sur vermiculite et/ou sur sol natif (**étape 2**).

Etape 1 : Morphologie de l'apex racinaire et caractérisation du RET chez *Balanites aegyptiaca*

Dans cette première étape, les expérimentations seront réalisées à partir de cultures hydroponiques de *Balanites aegyptiaca* après libération et stérilisation des graines. Les graines seront mises à germer sur papier humidifié ou en milieu gélosé.

1a : Caractéristiques des cellules frontières

Globalement, l'ensemble des travaux concernant l'étude des cellules frontières de racine, de type cellules bordantes (*Border cells*, BCs) ou cellules apparentées aux cellules bordantes (*Border-like cells*, BLCs), s'accordent à montrer qu'elles sont des acteurs importants au sein de la rhizosphère. Cette partie de l'étude sera donc consacrée à leur caractérisation détaillée chez *Balanites aegyptiaca* par des approches morphologiques, immunocytochimiques essentiellement à l'échelle de la microscopie optique (Microscopie optique en lumière transmise, Microscopie optique à épifluorescence et Microscopie optique confocale à balayage laser) et biochimiques. Dans un premier temps, des analyses morphologiques permettront de déterminer la diversité des populations cellulaires au sein des cellules frontières, le type de cellule frontière produit par la coiffe (BCs ou BLCs) et de caractériser le méristème sub-apical racinaire (*root apical meristem* : RAM Groot *et al.*, 2004 ; Hamamoto *et al.*, 2006) ainsi que le méristème de coiffe et la coiffe racinaire elle-même.

D'après les premières observations réalisées préalablement à ce travail, la coiffe racinaire produit essentiellement des cellules frontières de type BLCs qui se détachent par paquets de l'apex. Cependant ces cellules ont tendance à se disperser assez rapidement les unes des autres et de l'apex lors de l'hydratation de la pointe racinaire comparativement aux BLCs initialement décrites chez *Arabidopsis* (Vicré *et al.*, 2005) (**Figure 26**). La coloration cytochimique par le rouge de ruthénium (agent de coloration des molécules chargées négativement tels les composés pectiques) montre que

certaines paquets de cellules sont associés à un mucilage épais tandis que d'autres en sont moins richement pourvus (**Figure 26**).

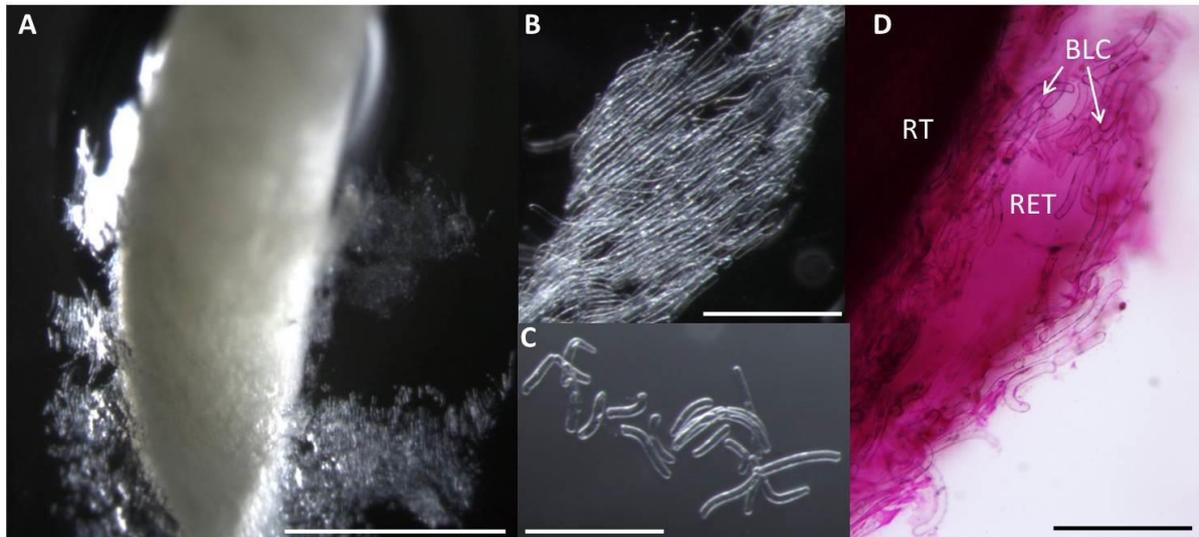


Figure 26 : Morphologie des cellules frontières produites par l'apex de *Balanites aegyptiaca*.

Les cellules frontières se détachent rapidement après l'hydratation de l'apex (**A**) par paquets (**B**). Après leur libération certaines cellules s'individualisent (**C**). Le RET est coloré par le rouge de ruthénium traduisant la présence de pectines.

BLCs, border-like cells ; RET, root extracellular trap; RT, root tip. Barre d'échelle: 500µm (A), 200µm (B, E), 100µm (C).

Pour compléter ces premières données, une analyse immunocytochimique ciblant notamment les composés pectiques et les AGPs sera envisagée. Un accent particulier sera donné à la caractérisation du piège extracellulaire de racine (RET, *Root extracellular trap*). Des sondes anticorps et des colorations cytochimiques spécifiques seront utilisées pour détecter les glycomolécules (pectines de type homogalacturonanes, xylogalacturonanes, AGPs) et l'ADN extracellulaire présents au sein du RET.

De plus, des analyses biochimiques de composition des parois cellulaires des cellules frontières sont aisément envisageables sur ce modèle végétal. La composition monosaccharidique par chromatographie en phase gazeuse, d'hydrolysats d'extraits bruts de paroi issus de l'apex ou des cellules frontières a déjà été menée. Ce premier niveau d'analyse montre des teneurs importantes en xylose dans les extraits pariétaux provenant des cellules frontières. Ceci pourrait être corrélé à la présence de pectines de type xylogalacturonane, dont la possible implication dans la défense est souvent suggérée, et déjà répertoriées comme des composés associés au RET chez les mutants *qua1-1* et *qua2-1* d'*Arabidopsis* (Durand *et al.*, 2009-**ACL07** ; Driouich *et al.*, 2012 – **OS03**). Des analyses de composition osidique de fractions enrichies en pectines ainsi que les études immunocytochimiques pourront confirmer ces données.

1b : Implication du RET dans les interactions plante-PGPRs

La densité microbienne rhizosphérique est bien plus importante par rapport au reste du sol. Il est admis que la production des exsudats racinaires joue un rôle majeur dans l'attraction des microorganismes telluriques et dans la constitution du microbiome rhizosphérique. Plusieurs études montrent que la majorité des exsudats racinaires sont issus de la coiffe racinaire (Griffin *et al.* 1975; Gunawardena *et al.* 2005). Ceci suggère que les cellules frontières produites par la coiffe sont largement impliquées dans la production des exsudats. Ainsi les éléments moléculaires du RET sont autant de signaux qui régulent les interactions racine-microorganismes au sein de la rhizosphère. Il semble que les effets du RET vis-à-vis des agents microbiens soient dépendants de l'espèce microbienne considérée. Le RET peut provoquer l'aggrégation et/ou l'arrêt de la croissance des microorganismes pathogènes ou bien exercer un effet répulsif (Hawes *et al.*, 1998 ; Hawes *et al.*,

2012). Connaître les effets des agents moléculaires du RET sur des microorganismes bénéfiques type PGPFs et PGPRs représente un enjeu scientifique particulièrement important dans le cadre du reboisement entrepris dans le programme GMV. En effet la colonisation de la rhizosphère par des agents microbiens bénéfiques peut participer à la « restructuration » du sol et contribuer ainsi au développement d'espèces végétales. C'est pourquoi, dans le contexte de cette thèse, les éventuels effets chimioattractifs du RET émanant du système racinaire du dattier du désert, vis-à-vis de deux souches PGPR modèles appartenant aux genres *Pseudomonas* et *Azospirillum* seront explorés. Les plantules de *B. aegyptiaca* seront inoculées avec les PGPRs modèles marquées de façon constitutive avec une protéine fluorescente afin d'évaluer le potentiel tropisme des PGPRs pour le RET. D'autre part, une souche d'*Azospirillum brasilense* contenant une fusion plasmidique *ipdC::gfp* (*indole-3 pyruvate decarboxylase* :: green fluorescent protein) sera également utilisée afin de détecter l'effet inducteur du RET sur l'expression du gène phytobénéfique *ipdC* impliqué dans la biosynthèse d'auxine par la PGPR. L'analyse des résultats de l'interaction entre bactéries et RET se fera par microscopie confocale à balayage laser. Cette étape sera réalisée en étroite collaboration avec les Dr G. Grundman et C. Prigent-Combaret (UMR CNRS 5557 de l'Université Claude Bernard, Lyon I). L'ADN extracellulaire étant un élément clef dans les propriétés de « trapping » du RET vis-à-vis des microorganismes (Wen *et al.*, 2007, 2009 ; Hawes *et al.*, 2011), l'impact des PGPRs modèles sur les teneurs en ADN extracellulaire sera évalué par des colorations cytochimiques spécifiques (coloration DAPI et SYTOX green). De plus, le degré d'implication des différents acteurs moléculaires présents au sein du RET dans les interactions plante-PGPRs, sera également exploré. Tandis qu'un traitement par des DNAses permettra d'évaluer l'impact de l'ADN extracellulaire, des applications de sondes anticorps spécifiques des AGPs ou du réactif de Yariv renseigneront sur l'effet des AGPs dans les interactions RET-PGPRs.

1c : Etude des exsudats racinaires

Afin de caractériser les interactions biotiques au sein de la rhizosphère de *Balanites aegyptiaca*, connaître la composition moléculaire des exsudats racinaires est un point crucial. C'est pourquoi dans ce projet, une analyse de la nature moléculaire des exsudats racinaires sera menée. Cette étape est envisagée en appliquant la méthodologie la plus communément mise en œuvre (von Wirén *et al.*, 1995 ; Bais *et al.*, 2006 ; Carvalhais *et al.*, 2011) et qui consiste à récolter puis à extraire les composés exsudés à partir de plantules en culture hydroponique en milieu liquide aéré. Cette approche ne permet pas d'appréhender toute la complexité des interactions biotiques de la rhizosphère, mais sera une première source de données intéressantes concernant les variétés moléculaires des exsudats racinaires produits par le dattier du désert. Alors que la composition en acides organiques, acides aminés, oligosaccharides, composés phénoliques et autres métabolites secondaires pourrait être envisagée dans le cadre d'une collaboration avec d'autres laboratoires spécialisés dans ces types d'analyses, la détection et la caractérisation des polysaccharides et AGPs sera menée par des approches biochimiques (immunoblotting, chromatographie phase gazeuse, etc...) parfaitement maîtrisées au sein du laboratoire GlycoMEV.

Etape 2 : Architecture du système racinaire et diversité microbienne dans la rhizosphère associée à *Balanites aegyptiaca*

Cette partie vise à appréhender les effets de la plante sur le microbiome rhizosphérique et réciproquement à évaluer l'impact de la diversité microbienne sur la morphologie des plantules et plus particulièrement celle du système racinaire. Ce travail sera réalisé en microcosmes sur sol inerte type vermiculite et sur sol natif GMV. Cette étape nécessitera des interactions fortes entre les différents partenaires : les laboratoires GlycoMEV / UMR CNRS 5557 et l'OHM Téssekéré.

2a : Architecture racinaire et dénombrement des cellules frontières

Pour être au plus proche des conditions appliquées sur le site GMV, les graines mises à germer sur papier humide, seront transférées sur de la vermiculite régulièrement arrosée (**Figure 27**). Ces

conditions de pépinières permettront le développement des plantules sur une période de 2 à 3 mois (**stade 1, S1**). A l'issue de ce stade 1, les plantules seront repiquées sur sol natif stérile ou non stérile et seront maintenues en culture en conditions d'hydratation variable (arrosage minimal pour être au plus proche des conditions GMV, et hydratation non limitante). La culture sera maintenue sur une période de 6 mois. Des plantes seront régulièrement prélevées : après 1 mois de repiquage (**stade 2, S2**), après 3 mois (**stade 3, S3**) et enfin à 6 mois (**stade 4, S4**). Pour chacun de ces prélèvements une analyse morphologique des plants sera réalisée (masse fraîche, masse sèche, architecture des systèmes caulinaires et racinaires). Une attention particulière sera donnée à la quantification des cellules frontières produites. Il s'agira ici d'adapter au modèle végétal de l'étude, un protocole proposé par Iijima *et al.*, en 2004 pour recueillir et compter les cellules bordantes produites par la coiffe racinaire de plantules de maïs cultivées dans un sol compact (Iijima *et al.*, 2000 ; 2004). En résumé, ce protocole consiste après extraction des plants de leur substrat à lessiver et soniquer les apex afin de récolter les populations de cellules frontières adhérentes à la racine. Parallèlement en procédant à des séries de centrifugation du substrat sur gradient de saccharose les cellules frontières présentes dans le sol sont séparées des particules du sol. Les fractions enrichies en cellules frontières ainsi que les cellules frontières libérées par lessivage des apex, sont colorées au bleu de toluidine et comptées par observation en microscopie optique en lumière transmise (Iijima *et al.*, 2000 ; 2004).

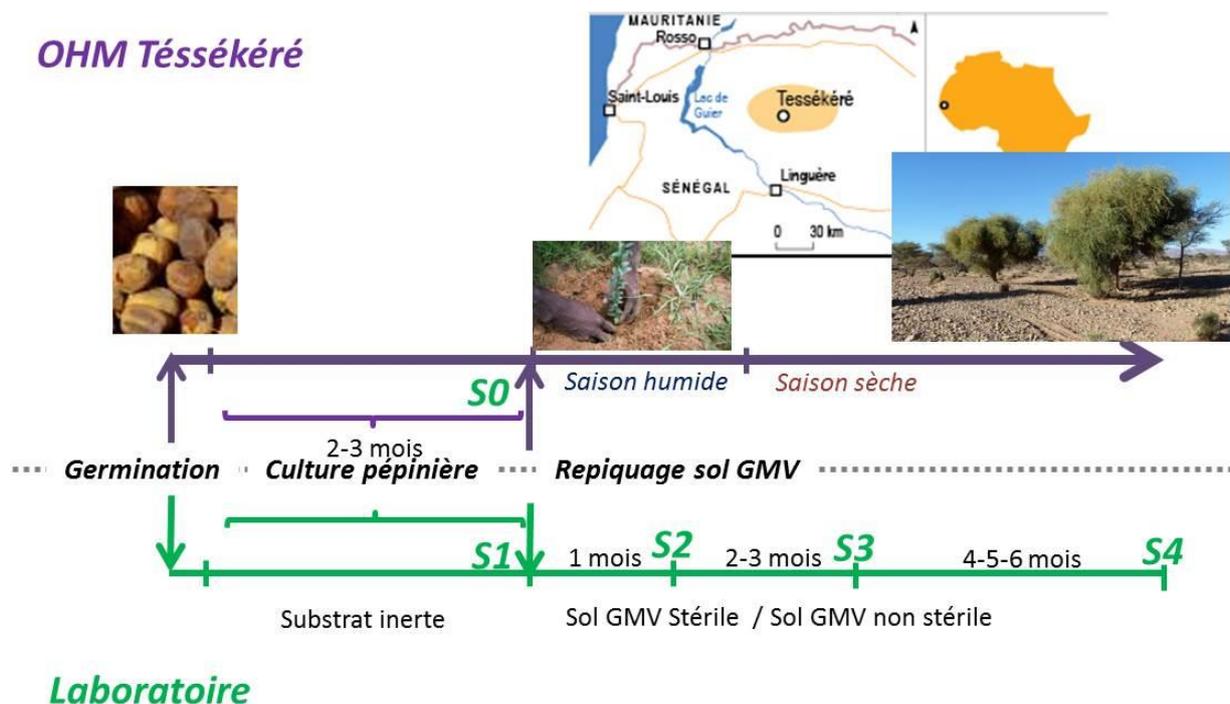


Figure 27 : Cultures des plants de *Balanites aegyptiaca* en conditions hydroponiques au laboratoire.

Sur le site GMV (OHM Tésékéré) les plantules sont maintenues en pépinière durant 2 à 3 mois avant d'être repiquées dans les parcelles de reboisement au moment de la saison humide. A l'échelle du laboratoire, pour être au plus près des conditions *in situ*, les plantules seront repiquées (stade 1, **S1**) sur sol GMV natif, stérile ou non stérile. Elles seront maintenues en culture dans des conditions d'hydratation minimale ou non sur une période de 6 mois (stade 4, **S4**). L'analyse morphologique des plants et le comptage des cellules frontières produites seront réalisés au moment du repiquage (stade 1, **S1**), 1 mois (stade 2, **S2**), 3 mois (stade 3, **S3**) ou 6 mois après le repiquage (stade 4, **S4**). Les analyses microbiologiques sur le sol non rhizosphérique sont en cours (stade 0, **S0**) et seront envisagées prioritairement au stade 4, et éventuellement au stade 3.

2b : Diversité microbienne au sein de la rhizosphère de *Balanites aegyptiaca*

Parallèlement aux analyses réalisées sur les plants de dattier du désert, une analyse microbiologique des sols sera également menée. Elle consistera tout d'abord à déterminer la diversité microbienne du sol natif non rhizosphérique (**stade 0, S0 ; Figure 27**), puis à évaluer cette diversité au cours des 6 mois de culture. Cette analyse microbiologique sera réalisée au laboratoire UMR CNRS 5557 de l'Université de Lyon I, sous l'encadrement du Dr G. Grundmann, spécialiste de la microbiologie des sols, par pyroséquençage de l'ADN 16S dans l'ADN extrait des différents sols.

Un premier prélèvement (sol GMV non rhizosphérique) a déjà été réalisé en Aout 2013 et transmis pour analyse. Pour limiter les coûts inhérents à cette étude microbiologique, nous nous limiterons probablement à 1 voire 2 autres prélèvements de sols rhizosphériques issus des cultures réalisées à GlycoMEV. Le stade 4 (\pm hydratation) sera prioritairement accompli, et éventuellement le stade 3 (\pm hydratation). Conjointement, le groupe des bactéries bénéfiques au développement de la plante (PGPRs) qui pourrait intervenir dans le succès de croissance de *Balanites aegyptiaca* sur le terrain sera étudié. Pour ce faire, sur les mêmes ADN extraits, l'expression de trois gènes liés à l'effet PGPR (2 gènes impliqués dans la modulation de la balance hormonale : *1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-ACC gene*, *acds* et *2,4 diacetylphloroglucinol phlD* / 1 gène impliqué dans la fixation d'azote : *nitrogen fixation regulator gene*) sera étudiée par la technique de qPCR.

6-2-4 Déterminisme biotique de l'émergence de la pourriture racinaire du pois et impact de biopesticides

Ce travail s'inscrit dans la continuité des recherches menées depuis plusieurs années entre le laboratoire GlycoMEV et le laboratoire Agri'Terr de l'Esitpa. Une thèse financée par la région de Haute-Normandie (GRR VASI) débutera au laboratoire Agri'Terr (Esitpa) mi-October 2013. Je co-encadrerai ce travail avec le Dr C. Gangneux du laboratoire Agri'Terr.

6-2-4-1 Contexte de l'étude

La biodiversité de l'écosystème « sols » dépend à la fois du type de plantes cultivées, des caractéristiques pédologiques mais également des choix agronomiques adoptés, qui vont participer à sélectionner des espèces microbiennes à même de moduler positivement ou négativement l'expression d'une maladie. L'appréhension de la diversité génétique par l'analyse des ADN ribosomiaux couplée aux méthodes d'étude des métagénomomes permet aujourd'hui d'envisager la caractérisation des espèces clés modulant les phytopathologies liées, notamment, aux cryptogames (oomycètes, fungi). Le sujet de thèse s'inscrit dans cette démarche et a pour objectif de modéliser l'expression d'une phytopathologie en regard des cohortes de microorganismes régulateurs de l'expression de cette maladie. Cette analyse sera réalisée en considérant différents contextes agronomiques (itinéraires techniques, variétés de pois, apport de biopesticides/agents de bio-contrôle).

Le modèle d'étude est le pathosystème pois/*Aphanomyces euteiches* appréhendé à trois échelles de travail (cosme, parcelle, territoire) selon 4 axes :

1. Déterminants de la dynamique d'*Aphanomyces euteiches* au sein des rotations culturales ?
2. Déterminants biotiques de l'émergence de la maladie à l'échelle de la parcelle ?
- 3. Molécules de défense de la plante exprimées en réponse au pathogène ?**
- 4. Effets de l'apport d'agents de bio-contrôle sur le cycle de développement du pathogène, la réponse immunitaire de la plante et l'émergence de la maladie?**

6-2-4-2 Description de l'étude

Dans ce programme, j'encadrerai plus spécifiquement certains aspects relatifs aux points 3 et 4. Des analyses par immuno-microscopies (Microscopie confocale à balayage laser et microscopie électronique à transmission (MET), PRIMACEN) permettront de suivre les molécules de défense produites chez le pois en réponse au pathogène. La production de ROS ainsi que les modifications des parois cellulaires seront étudiées par les approches microscopiques déjà mises en œuvre au laboratoire notamment sur le lin. L'analyse d'expression des gènes de défense codant pour des peptides antimicrobiens de type défensines ou des enzymes de type glucanases, phénylalanine ammonia-lyase sera suivie par q-PCR. Un accent particulier sera mis sur l'étude des potentialités des AGPs comme substances de bio-contrôle capables de limiter l'infection du pois par l'oomycète *Aphanomyces euteiches*.

Ce premier axe de recherche, que je souhaite développer, s'inscrit dans la continuité des études menées actuellement au laboratoire, concernant l'implication des cellules frontières de type BLC dans la défense des plantes vis-à-vis de stress biotiques, mais permettra également d'initier l'exploration de la **fonction des cellules frontières** lors des **interactions plantes-microorganismes bénéfiques**.

A plus long terme, j'envisage d'étendre ce champ d'investigation (**interactions cellules frontières – PGPRs/PGPFs et autres microorganismes bénéfiques**) en réalisant d'autres **études sur des modèles végétaux** notamment ceux plus adaptés à des analyses d'expression génique (**Arabidopsis** et **lin** par exemple).

Dans un contexte environnemental de réchauffement climatique et de raréfaction des ressources en eau, les données obtenues sur la physiologie du système racinaire (et plus spécifiquement sur la caractérisation des cellules frontières et du piège extracellulaire de la racine) du dattier du désert seront importantes. *Balanites aegyptica* est en effet une plante particulièrement tolérante à la sécheresse, et les données obtenues dans ce travail ouvriront des perspectives de recherches intéressantes visant à **explorer la fonction des cellules frontières lors de stress abiotiques type déficit hydrique**.

6-3 Effets de peptides et glycopeptides végétaux dans le renforcement de la barrière cutanée

Suite à l'étude initiée lors du programme SkinOFlor (thèse **G. Percoco**), je souhaite étendre les recherches sur le volet dermocosmétique. En Juin 2012, notre laboratoire (Pr A. Driouich et **Dr ML. Follet-Gueye**) s'associe à d'autres laboratoires de la zone géographique France (Manche) - Angleterre en répondant à un appel à projet européen Interreg IV. Ce projet, porté par le Dr D. Vaudry et le Pr A. Driouich, s'intitule *Peptide Research Network of Excellence* (PeReNE). Sur ce projet nous avons recruté le 01 Juin 2013 le **Dr Abderrakib Zahid** en tant que post-doctorant (CDD 15 mois) co-encadré par le Pr A. Driouich et le **Dr ML. Follet-Gueye**. De plus, le montage d'un **contrat doctoral CIFRE** en partenariat avec l'entreprise Bio-Europe (Groupe Solabia, Anet) est en cours. Je serai co-directrice avec le Pr A. Driouich de cette thèse.

Les recherches menées dans ce volet de recherches à applications dermocosmétiques consisteront à :

1-étudier les potentialités stimulantes, vis-à-vis de la **défense cutanée de type inné, d'éliciteurs peptidiques endogènes végétaux** (*Systemins* et *Hydroxyproline systemins*) et d'**AGPs** (projet PeReNE).

2-évaluer les propriétés hydratante et anti-âge de **glycomolécules** d'origine microbienne et **végétale (AGPs)** (Thèse CIFRE, partenariat Bio-Europe).

6-3-1 Contexte de l'étude

Renforcer la barrière cutanée est une problématique majeure en recherche et développement du secteur dermocosmétique, que ce soit pour des applications visant à augmenter la **défense cutanée**, ou pour le développement d'actifs à **propriétés hydratante et anti-âge**. Plusieurs travaux relatent les effets d'extraits végétaux enrichis en glycomolécules pariétales sur la prolifération et/ou la différenciation de lignées cellulaires de fibroblastes et de kératinocytes en culture *in vitro* (Deters *et al.*, 2005 ; Zippel *et al.*, 2009). De plus, les propriétés anti-oxydantes de peptides et glycomolécules d'origine végétale ont récemment été décrites (Apone *et al.*, 2010). Dans ce contexte, ce projet vise à tester les potentialités de **peptides végétaux** et d'**AGPs** sur le renforcement de la fonction barrière de la peau.

Les cellules végétales et certaines cellules de mammifères, dont les kératinocytes, pour répondre aux dommages dus à des stress environnementaux, mettent en place des mécanismes cellulaires et moléculaires relativement proches (§ 5-2-2-3). Partant de ce caractère universel des réponses cellulaires eucaryotes à des facteurs de stress, deux types de molécules ont été choisies sur la base de leur fonction élicitrice avérée (**peptides végétaux**) et potentielle (**AGPs**) chez les végétaux supérieurs.

Pour rappel (§ 5-2-2-2), les éliciteurs végétaux endogènes nommés *Damage-Associated Molecular Patterns* (DAMPs) sont des molécules qui de façon similaire aux *Pathogenesis-Associated Molecular Patterns* (PAMPs) contribuent chez les plantes à la mise en place de la défense systémique. Les DAMPs, aussi appelées « *alarmins* », peuvent être des fragments de parois, tels des oligogalacturonides, OGs (Spiro *et al.*, 1998 ; De Lorenzo *et al.*, 2011) et des glycopeptides issus d'AGPs (Nguema-Ona *et al.*, 2013, **Figure 23**), ou des peptides et glycopeptides libérés et/ou sécrétés dans le milieu extracellulaire. En 1991, Pearce *et al.*, identifient chez la tomate un peptide de 18 acides aminés (aa) (**Figure 28**) capable d'induire des mécanismes de défense identiques à ceux mis en place lors de blessure ou d'attaque par des herbivores. Ce peptide, issu d'une protéine précurseur cytoplasmique de 200 aa (dépourvu de peptide signal en position Nterminale), est libéré lors de la

lyse cellulaire au site de blessure. Induisant la synthèse et l'accumulation d'inhibiteur de protéase dans toute la plante, ce peptide fut appelé systémine (*systemin*). D'autres peptides possédant un peptide signal en position Nterminale et des résidus hydroxyproline (Hyp) ont depuis été identifiés chez d'autres plantes de la famille des Solanacées (Yamaguchi *et al.*, 2011) et sont appelés *Hydroxyproline systemins* (HypSys). Les HypSys sont présentes chez de nombreuses familles de plantes et sont impliquées non seulement dans les défenses lors des attaques d'herbivores mais également lors d'infection par des agents pathogènes (Pearce *et al.*, 2011).

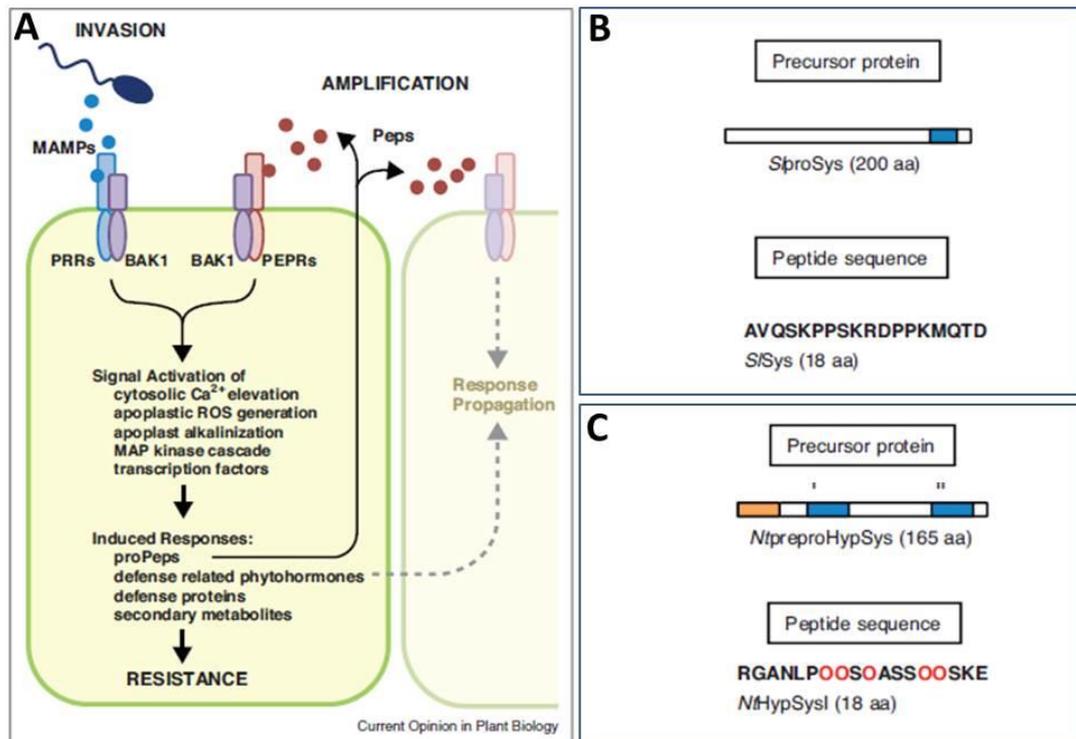


Figure 28: Les éliciteurs peptidiques endogènes : séquence peptidique et implication dans les mécanismes de défense *in planta*. Yamaguchi *et al.*, 2011.

(A), La cellule végétale perçoit les *microbe-associated molecular patterns* (MAMPs) via les récepteurs *pathogenesis related receptors* (PRRs). Suite à l'interaction MAMPs-PRRs, le PRR forme un hétérodimère avec une protéine kinase membranaire (*BRI1 associated kinase*, BAK1). Ceci active une voie de signalisation intracellulaire impliquant une augmentation du calcium cytosolique, la production d'espèces réactives de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species*, ROS) et l'activation de *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs). Cette voie de signalisation conduit à la production de protéines de défense et de métabolites secondaires, impliqués dans la résistance. Simultanément, les précurseurs protéiques des éliciteurs endogènes peptidiques (*precursor proteins of elicitor peptides*, proPeps) et les hormones de défense (acide salicylique, acide jasmonique, éthylène) sont produits. Après leur maturation et leur libération, les éliciteurs peptidiques endogènes (*elicitor peptides*, Peps) sont perçus par des récepteurs (*Pep receptors*, PEPRs). Les PEPRs via leur interaction avec BAK1 activent à nouveau les voies de signalisation intracellulaire. (B), Séquence peptidique de la systémine de tomate (S/Sys) synthétisée à partir d'un précurseur protéique de 200 aa dépourvu de peptide signal en position Nterminale. (C), Séquence peptidique de l'hydroxyproline systémine I de tabac (NtHypSys) synthétisée à partir d'un précurseur protéique de 165 aa comprenant un peptide signal en position Nterminale (cadre orange). Les cadres bleus indiquent la présence des séquences biologiquement actives.

Les AGPs décrites préalablement dans ce manuscrit (§ 6-1-2) dont nous avons récemment montré quelles étaient impliquées dans certaines interactions plante(s)-pathogène(s) (Cannesan *et al.*, 2012-ACL12) peuvent être potentiellement actives sur la physiologie cutanée. Une fraction pariétale issue de graines de cassisier (*Ribes nigrum*) enrichie en AGPs, stimule la prolifération cellulaire de kératinocytes en culture sans induire leur différenciation (Zippel *et al.*, 2009). Dans cette étude, il est

montré sur des lignées de fibroblastes et de kératinocytes en culture, que cette fraction pariétale induit l'expression de plusieurs gènes impliqués notamment dans la voie de signalisation *via* les MAP-kinases, dans la synthèse de protéines de la matrice extracellulaire, ainsi que dans les processus de réparation de l'ADN. Alors que le traitement de cette fraction pariétale enrichie en AGPs par une α -L-arabinofuranosidase ne perturbe pas son activité biologique, l'action de β -D-galactosidase l'inhibe significativement. Des travaux publiés par le même laboratoire en 2010, confirment l'impact d'autres AGPs, extraites de graines de *Jatropha curcas*, sur la physiologie cutanée (Zippel *et al.*, 2010) et montrent l'effet protecteur vis-à-vis du stress oxydatif de la fraction pariétale enrichie en AGPs testée, suggérant une possible application comme actif anti-âge. Contrairement aux résultats décrits dans l'étude précédente, cette fraction pariétale riche en AGPs, issue des graines de *Jatropha*, induit la différenciation de kératinocytes en culture, sans avoir d'effet sur leur prolifération. Ces résultats supposent que les effets biologiques des glycomolécules végétales sont variables en fonction des espèces végétales explorées, et probablement dépendants des structures glycaniques. Dans ces deux études, l'analyse structurale des fractions enrichies en AGPs indique leur caractère non classique, révélé par leur teneur faible en acide aminé Hyp. Les mécanismes moléculaires d'action des AGPs ou d'autres glycomolécules de haut poids moléculaires sur la physiologie cutanée sont à ce jour méconnus. Les récepteurs membranaires tels les EGF-R (*Epidermal-growth factor receptor*), et KGF-R (*Keratinocyte-growth factor receptor*) sont pressentis pour interagir avec les polysaccharides (Deters *et al.*, 2005 ; Pastore *et al.*, 2008). Grâce aux compétences scientifiques et techniques du laboratoire GlycoMEV concernant l'extraction, la purification et la caractérisation des AGPs, l'un des objectifs de ce projet vise à mieux cerner leurs actions sur la physiologie cutanée.

A ce jour, la plupart des expérimentations ont été conduites sur des lignées cellulaires en culture *in vitro*, modèles expérimentaux qui ne permettent d'explorer qu'un seul type cellulaire. A part quelques travaux réalisés sur des modèles de peaux reconstituées (*skin equivalents*), rares sont les données expérimentales concernant les effets de glycomolécules de haut poids moléculaires déposées à la surface du *stratum corneum*. La combinaison de la microdissection laser à l'analyse qPCR, méthodologie que nous avons adapté à l'exploration d'explant de peau humaine, maintenus en survie une dizaine de jours, durant la thèse de Dr G. Percoco, offre des perspectives très prometteuses pour progresser dans la compréhension des mécanismes d'action des molécules végétales dont nous souhaitons explorer les effets dans ce projet.

6-3-2 Description du projet

Deux peptides végétaux ont été synthétisés (Service de Synthèse peptidique, Dr Jérôme Leprince, PRIMACEN, Université de Rouen) : la systémine de tomate et une HypSystémine de tabac (**Figure 28 B et 28C**). Dans le même temps, le Dr Eric Nguema-Ona, post-doctorant au laboratoire GlycoMEV, travaille à l'extraction et à la caractérisation d'AGPs à partir d'un grand nombre d'espèces végétales (espèces cultivées ou espèces endémiques du continent africain ou du sous-continent indien). La caractérisation de leur structure glycanique, et l'obtention, par hydrolyse enzymatique d'une collection de fragments oligosaccharidiques et oligoglycopeptidiques de structure différente sont actuellement en cours. Par ailleurs, dans le cadre du partenariat CIFRE, l'entreprise Bio-Europe procède également à l'extraction de glycomolécules d'origine bactérienne et fongique.

Un premier criblage des molécules extraites et purifiées sera mené sur la base de plusieurs paramètres qui seront testés sur des lignées de cellules cutanées en culture *in vitro* (culture de fibroblastes et de kératinocytes). La lignée cellulaire HaCaT (Cell Lines Service, Boukamp *et al.*, 1988) est une lignée de kératinocytes cutanés humains immortalisés qui nous a été fournie par le Dr Michel Simon (CNRS, Université de Toulouse III). Seront explorés le stress oxydatif, ainsi que la prolifération et la différenciation cellulaires par des approches de criblage haut débit basées sur l'utilisation de

sondes fluorescentes spécifiques (Krishnan *et al.*, 2008). Ces analyses permettront de sélectionner rapidement les molécules les plus intéressantes au sein des extraits végétaux et microbiens.

Une orientation particulière sera donnée dans ce projet visant à caractériser l'impact des glycomolécules testées sur l'expression de gènes cibles : gènes codant des protéines structurales, gènes de défense (stress oxydatif, *inflammaging* et peptides anti-microbiens), et gènes codant des protéines impliquées dans la prolifération cellulaire. L'analyse transcriptomique ciblée sera réalisée par qPCR en temps réel (Service qPCR, PRIMACEN). Tout d'abord menée sur les lignées de cellules cutanées, ces analyses seront ensuite appliquées sur des explants de peau humaine maintenus en survie une dizaine de jours (Collaboration, laboratoire Bio-EC). Dans ce dernier cas l'analyse qPCR pourra être couplée à la microdissection laser des cellules cutanées permettant d'isoler le derme de l'épiderme et également de séparer très finement les différentes assises de l'épiderme. Cette approche originale, très peu utilisée à ce jour dans le secteur dermocosmétique, a été récemment développée par le laboratoire GlycoMEV (Percoco *et al.*, 2012-**ACL10** ; Percoco *et al.*, *In press-ACL14*). A l'issue de cette étape, 2 à 3 molécules à effet stimulant sur la défense cutané de type innée et/ou à propriétés hydratante et anti-âge seront sélectionnées.

Les molécules sélectionnées au cours de l'étape précédente seront soumises à une analyse structurale précise. Eventuellement ces molécules seront dégradées notamment par hydrolyse enzymatique afin de déterminer la portion de la glycomolécule impliquée dans l'activité biologique. Ainsi l'analyse transcriptomique ciblée sur explants de peau microdisséqués pourra à nouveau être envisagée après application des différentes fractions de la molécule à la surface de l'explant. D'un point de vue fondamental, ces analyses aideront à mieux cerner les mécanismes d'action des glycomolécules sur la physiologie cutanée. Ces travaux seront complétés par des études immunocytochimiques et morphologiques par microscopie optique à balayage laser et par cryomicroscopie électronique à transmission.

7 – Conclusions

La matrice extracellulaire végétale ou paroi contrôle la croissance et le développement de la plante et constitue une barrière protectrice vis-à-vis de stress environnementaux.

Au cours de mes activités de recherche, *via* l'utilisation d'**approches microscopiques**, la **cartographie précise d'enzymes de biosynthèse de composés hémicellulosique et pectique** a pu être menée.

Secondairement, en étroite collaboration avec le Dr M. Vicro-Gibouin, j'ai participé aux **caractérisations morphologique et immunocytochimique des cellules frontières de racine** issues de différents végétaux. Conjointement à ces travaux, le degré d'implication des cellules frontières de type BLCs dans la défense du système racinaire lors d'infection par des agents pathogènes est exploré.

Je souhaite maintenant poursuivre mes recherches liées à l'étude **du système immunitaire végétal**. Une attention particulière sera donnée à l'étude des cellules et des glycomolécules générées par la coiffe racinaire, le Piège Extracellulaire de la Racine (PER) ou *Root Extracellular Trap* (RET) (**Figure 29A**).

Ce travail se décline en 2 aspects :

1-déterminer la nature des interactions biotiques au sein de la rhizosphère entre les cellules frontières (type BCs ou BLCs) et les microorganismes du sol ;

2-évaluer le rôle des AGPs (molécules fortement présentes à la surface des cellules frontières et dans les exsudats racinaires) dans les interactions avec les microorganismes pathogènes ou **bénéfiques** du sol.

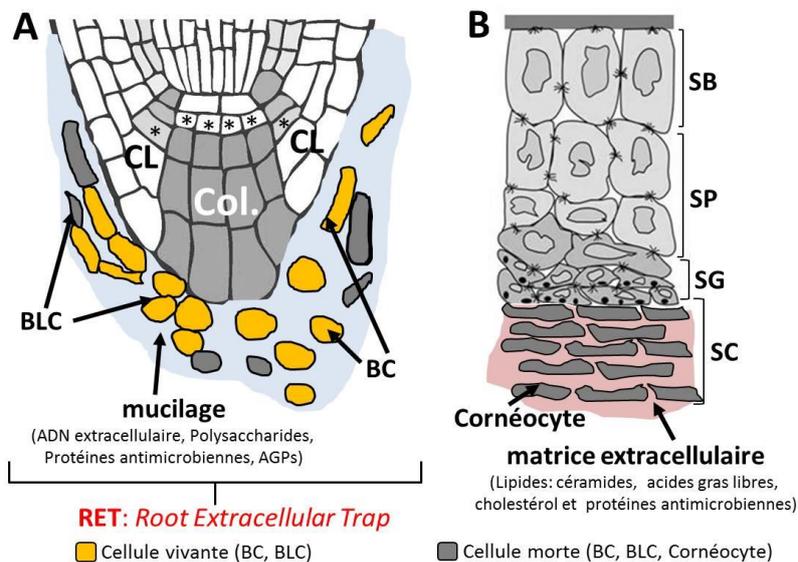


Figure 29: Coiffe racinaire (A) et épiderme (B): deux structures protectrices étonnamment semblables !

(A), La coiffe racinaire protège le méristème racinaire. Le méristème de coiffe (*) fonctionne de façon continue et produit les cellules de la columelle et les cellules latérales de la coiffe. Suite à leur progression dans la coiffe, les cellules les plus différenciées se détachent mais restent vivantes : « cellules frontières ». Enrobées dans un mucilage plus ou moins dense, elles forment avec ce dernier un piège à l'apex racinaire (*Root Extracellular Trap*, RET) notamment riche en AGPs. (B), L'épiderme protège les organismes mammifères des stress environnementaux. Les kératinocytes progressent de la couche basale vers la couche cornée de façon continue. Le stade ultime de différenciation se caractérise par la desquamation des kératinocytes (cornéocytes) qui sont alors des cellules mortes. Les cornéocytes sont enrobés dans une matrice lipidique qui contient notamment des peptides antimicrobiens sécrétés par les kératinocytes du SG. Des petites molécules d'origine exogène peuvent franchir la barrière lipidique du SC et déclencher des mécanismes de défense innée au niveau des couches

vivantes de l'épiderme. BLC, *Border-Like Cell* ; BC, *Border Cell* ; Col., Columelle ; CL, cellules latérales ; SB, *stratum basale* ; SP, *Stratum spinosum* ; SG, *Stratum granulosum* ; SC, *stratum corneum*.

De plus, en observant une similitude dans l'organisation de la coiffe racinaire et du tissu épidermique (**Figure 29A** et **29B**), et en constatant des convergences des mécanismes de défense lors de la réponse immunitaire des cellules végétales et de type inné des kératinocytes, j'ai initié des recherches visant à **tester l'effet de molécules élicitrices d'origine végétale** (notamment les AGPs) **sur la défense cutanée**.

Etant donné la grande diversité du monde végétal, **les glycomolécules de la matrice extracellulaire végétale** représentent une source considérable de biomolécules offrant des perspectives de recherches scientifiques passionnantes, ayant pour objectifs i) l'amélioration de la santé des plantes et ii) l'identification de molécules naturelles d'origine végétale bénéfiques pour la santé humaine.

8 – Références bibliographiques

- Albersheim P., Darvill AG., O'Neill MA., Schols HA., Voragen AGJ. (1996).** A hypothesis : the same six polysaccharides are components of the primary cell walls of all higher plants. *In Pectine and Pectinase*. Visser J., Voragen (Eds.), Elsevier Science, Amsterdam. pp 47–55.
- Andème-Onzighi C., Lhuissier F., Vicré M., Yamada H., Driouich A. (2000).** A (1-3,6)-beta-d-galactosyl epitope containing uronic acids associated with bioactive pectins occurs in discrete cell wall domains in hypocotyl and root tissues of flax seedlings. *Histochem. Cell Biol.* 113 : 61-70.
- Andème-Onzighi C., Sivaguru M., Judy-March J., Baskin TI., Driouich A. (2002).** The reb1-1 mutation of Arabidopsis alters the morphology of trichoblasts, the expression of arabinogalactan-proteins and the organization of cortical microtubules. *Planta.* 215(6) : 949-58.
- Anderson CM., Wagner TA., Perret M., He ZH., He D., Kohorn BD. (2001).** WAKs : cellwall-associated kinases linking the cytoplasm to the extracellular matrix. *Plant Mol.Biol.* 47 : 197–206.
- Apone F., Tito A., Carola A., Arciello S., Tortora A., Filippini L., Monoli I., Cucchiara M., Gibertoni S., Chrispeels MJ., Colucci G. (2010).** A mixture of peptides and sugars derived from plant cell walls increases plant defense responses to stress and attenuates ageing-associated molecular changes in cultured skin cells. *J. Biotechnol.* 145(4) : 367-76.
- Atmodjo MA., Sakuragi Y., Zhu X., Burrell AJ., Mohanty SS., Atwood JA. 3rd, Orlando R., Scheller HV., Mohnen D. (2011).** Galacturonosyltransferase (GAUT)1 and GAUT7 are the core of a plant cell wall pectin biosynthetic homogalacturonan: galacturonosyltransferase complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108 :20225–30.
- Atmodjo MA., Hao Z., Mohnen D. (2013).** Evolving views of pectin biosynthesis. *Annu Rev Plant Biol.* 64 :747-79.
- Ausubel FM. (2005).** Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nat Immunol.* 6 (10) : 973-9.
- Aziz A., Heyraud A., Lambert B. (2004).** Oligogalacturonide signal transduction, induction of defense-related responses and protection of grapevine against *Botrytis cinerea*. *Planta.* 218 : 767–774.
- Bais HP., Weir TL., Perry LG., Gilroy S., Vivanco JM. (2006).** The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu Rev Plant Biol.* 57 : 233-66.
- Barber C., Rösti J., Rawat A., Findlay K., Roberts K., Seifert GJ. (2006).** Distinct properties of the five UDP-D-glucose/UDP-D-galactose 4-epimerase isoforms of Arabidopsis thaliana. *J. Biol. Chem.* 281 : 17276-17285.
- Beauregard PB., Chai Y., Vlamakis H., Losick R., Kolter R. (2013).** *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110 (17) : E1621-30.
- Bennett T, van den Toorn A, Sanchez-Perez GF, Campilho A, Willemsen V, Snel B, Scheres B (2010).** SOMBRERO, BEARSKIN1, and BEARSKIN2 regulate root cap maturation in Arabidopsis. *Plant Cell.* 22 (3): 640-54.
- Berendsen RL., Pieterse CM., Bakker PA. (2012).** The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends Plant Sci.* 17 (8) : 478-86.
- Boevink P., Oparka K., Santa Cruz S., Martin B., Betteridge A., Hawes C (1998).** Stacks on tracks: the plant Golgi apparatus traffics on an actin/ER network. *Plant J.* 15 : 441–447.
- Boukamp P., Petrussevska RT., Breitkreutz D., Hornung J., Markham A., Fusenig NE., (1988).** Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.* 106 : 761–771.
- Branca C., DeLorenzo G., Cervone F.(1988).** Competitive inhibition of the auxin-induced elongation by α -D-oligogalacturonides in pea stemsegments. *Physiol.Plant.* 72 : 499–504.
- Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss DS., Weinrauch Y., Zychlinsky A. (2004).** Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303 : 1532–1535.
- Brinkmann V., Laube B., Abu Abed U., Goosmann C., Zychlinsky A. (2010).** Neutrophil extracellular traps: how to generate and visualize them. *Journal of Visual Experimentation.* 36 : 1724 .

- Burget E., Reiter WD. (1999).** The mur4 mutant of Arabidopsis is partially defective in the *de novo* synthesis of uridine diphospho L arabinose. *Plant Physiol.* 121 : 383-389.
- Burget EG., Verma R., Molhoj M., Reiter WD. (2003).** The biosynthesis of L-arabonise in plants : molecular cloning and characterization of a Golgi-localized UDP-D-xylose 4-epimerase encoded by the MUR4 gene of Arabidopsis. *Plant Cell.* 15 : 523-531.
- Carpita N., McCann M. (2000).** The cell wall. In Buchanan BB, Grisse W, Jones RL (eds) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, pp 52-108.
- Carvalhais LC., Dennis PG., Fedoseyenko D., Hajirezaei MR., Borriss R., von Wirén N. (2011).** Root exudation of sugars, amino acids, and organic acids by maize as affected by nitrogen, phosphorus, potassium, and iron deficiency. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science.* 174 : 3–11.
- Cavalier DM. and Keegstra K. (2006).** Two xyloglucan xylosyltransferase catalyze the addition of multiple xylosyl residues to a celohexaose. *J. Biol. Chem.* 281 : 34197–34207.
- Cervone F., Hahn MG., De Lorenzo G., Darvill A., Albersheim P. (1989).** Host–pathogen interactions. XXXIII. A plant protein converts a fungal pathogenesis factor into an elicitor of plant defense responses. *Plant Physiol.* 90 : 542–548.
- Chou YH., Pogorelko G., Zobotina OA. (2012).** Xyloglucan xylosyltransferases XXT1, XXT2, and XXT5 and the glucan synthase CSLC4 form Golgi-localized multiprotein complexes. *Plant Physiol.* 159 : 1355–66.
- Citovsky V., Gafni Y., Tzfira T. (2008).** Localizing protein-protein interactions by bimolecular fluorescence complementation in planta. *Methods.* 45(3) : 196-206.
- Clark R., Kupper T. (2005).** Old meets new : the interaction between innate and adaptive immunity. *J Invest Dermatol.* 125 : 629–637.
- Clausen MH., Willats WG., Knox JP. (2003).** Synthetic methyl hexagalacturonate hapten inhibitors of anti-homogalacturonan monoclonal antibodies LM7, JIM5 and JIM7. *Carbohydr Res.* 338 (17) : 1797-800.
- Cocuron JC., Lerouxel O., Drakakaki G., Alonso AP., Liepman AH., Keegstra K., Raikhel N., Wilkerson CG. (2007).** A gene from the cellulose synthase-like C family encodes a beta-1,4 glucan synthase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 104 : 8550–8555.
- Cosgrove DJ. (2000).** Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature.* 407 : 321–326.
- Cosgrove, D.J. (2005).** Growth of the plant cell wall. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 850–861.
- Curlango-Rivera G., Hawes MC. (2011).** Root tips moving through soil: an intrinsic vulnerability. *Plant Signal Behavior.* 6 : 1–2.
- Curlango-Rivera G., Huskey DA., Mostafa A., Kessler JO., Xiong Z., Hawes MC. (2013).** Intraspecies variation in cotton border cell production: Rhizosphere microbiome implications. *Am J Bot.* 100(9) : 1706-12. doi: 10.3732/ajb.1200607.
- Dahiya P., Findlay K., Roberts K., McCann MC. (2006).** A fasciclin-domain containing gene, ZeFLA11, is expressed exclusively in xylem elements that have reticulate wall thickenings in the stem vascular system of *Zinnia elegans* cv Envy. *Planta.* 223 : 1281–91.
- De Lorenzo G., Brutus A., Savatin DV., Sicilia F., Cervone F. (2011).** Engineering plant resistance by constructing chimeric receptors that recognize damage-associated molecular patterns (DAMPs). *FEBS Lett.* 585 (11) : 1521-8.
- Decreux A., Messiaen J. (2005).** Wall-associated kinase WAK1 interacts with cell wall pectins in a calcium-induced conformation. *Plant Cell Physiol.* 46 : 268–278.
- Delgado IJ., Wang Z., deRocher A., Keegstra K., Raikhel NV. (1998).** Cloning and characterization of AtRGP1. A reversibly autoglycosylated Arabidopsis protein implicated in cell wall biosynthesis. *Plant Physiol.* 116 : 1339–1350.
- Denecker G., Ovaere P., Vandenabeele P., Declercq W. (2008).** Caspase-14 reveals its secrets. *J Cell Biol.* 180 : 451–458.

- Deters AM., Schröder KR., Hensel A. (2005).** Kiwi fruit (*Actinidia chinensis* L.) polysaccharides exert stimulating effects on cell proliferation *via* enhanced growth factor receptors, energy production, and collagen synthesis of human keratinocytes, fibroblasts, and skin equivalents. *J Cell Physiol.* 202 : 717–22.
- Dettmer J., Hong-Hermesdorf A., Stierhof YD., Schumacher K. (2006).** Vacuolar H⁺-ATPase activity is required for endocytic and secretory trafficking in Arabidopsis. *The Plant Cell.* 18 : 715–730.
- Dhugga KS., Tiwari SC., Ray PM. (1997).** A reversibly glycosylated polypeptide (RGP1) possibly involved in plant cell wall synthesis: purification, gene cloning, and *trans*-Golgi localization. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 94 : 7679–7684.
- Donohoe BS., Kang BH., Gerl MJ., Gergely ZR., McMichael CM., Bednarek SY., Staehelin LA. (2013).** Cis-Golgi cisternal assembly and biosynthetic activation occur sequentially in plants and algae. *Traffic.* 14(5) : 551-67.
- Drakakaki G., Zabolina O., Delgado I., Robert S., Keegstra K., Raikhel N. (2006).** Arabidopsis reversibly glycosylated polypeptides 1 and 2 are essential for pollen development. *PlantPhysiol.* 142 : 1480–1492.
- Driouich A., Faye L., Staehelin LA. (1993).** The plant Golgi apparatus: a factory for complex polysaccharides and glycoproteins. *Trends Biochem.Sci.* 18 : 210–214.
- Driouich A., Levy S., Staehelin LA., Faye L. (1994).** Structural and functional organization of the Golgi apparatus in plant cells. *Plant Physiol.* 32 : 731–749.
- Driouich A., Staehelin LA. (1997).** “The plant Golgi apparatus: Structural organization and functional properties”, in *The Golgi Apparatus*, ed.E.G.Berger(Basel:J.Roth Birkhauser), pp 275–301.
- Driouich A., Durand C., Vitré-Gibouin M. (2007).** Formation and separation of root border cells. *Trends in Plant Science.* 12 : 14-19.
- Driouich A., Follet-Gueye ML., Bernard S., Kousar S., Chevalier L., Vitré-Gibouin M., Lerouxel O. (2012).** Golgi-mediated synthesis and secretion of matrix polysaccharides of the primary cell wall of higher plants. *Frontiers in Plant Science.* doi : 10.3389/fpls.2012.00079.
- Drogue B., Dore H., Borland S., Wisniewski-Dyé F., Prigent-Combaret C.(2012).** Which specificity in cooperation between phytostimulating rhizobacteria and plants? *Res.Microbiol.* 163 : 500–510. doi: 10.1016/j.resmic.2012.08.006.
- Durand C., Vitré-Gibouin M ; Follet-Gueye ML., Duponchel L., Moreau M., Lerouge P., Driouich A. (2009).** The organization pattern of root border-like cells of Arabidopsis thaliana is dependent on cell wall homogalacturonan. *Plant Physiol.* 150 : 1411–1421.
- Ellis M., Egelund J., Schultz CJ., Bacic A. (2010).** Arabinogalactan-proteins: key regulators at the cell surface? *Plant Physiology.* 153 : 403-419.
- Faik A., Price NJ., Raikhel NV., Keegstra K. (2002).** An Arabidopsis gene encoding an α -xylosyltransferase involved in xyloglucan biosynthesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 99 : 7797–7802.
- Ferrari S., Galletti R., Denoux C., De Lorenzo G., Ausubel FM., Dewdney J. (2007).** Resistance to *Botrytis cinerea* induced in Arabidopsis by elicitors is independent of salicylic acid, ethylene, or jasmonate signaling but requires PHYTOALEXIN DEFICIENT 3. *Plant Physiol.* 144 : 367–379.
- Ferrari S., Savatin DV., Sicilia F., Gramegna G., Cervone F., De Lorenzo G. (2013).** Oligogalacturonides : plant damage-associated molecular patterns and regulators of growth and development. *Front Plant Sci.* 4 : 49. doi: 10.3389/fpls.2013.00049.
- Fliegmann J., Mithofer A., Wanner G., Ebel J. (2004).** An ancient enzyme domain hidden in the putative beta-glucan elicitor receptor of soybean may play an active part in the perception of pathogen-associated molecular patterns during broad host resistance. *J. Biol. Chem.* 279 : 1132-1140.
- Flors C., Fryer MJ., Waring J., Reeder B., Bechtold U., Mullineaux PM., Nonell S., Wilson MT., Baker NR. (2006).** Imaging the production of singlet oxygen *in vivo* using a new fluorescent sensor, Singlet Oxygen Sensor Green. *J Exp Bot.* 57(8) :1725-34.

- Franchi L., Warner N., Viani K., Nuñez G. (2009).** Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol Rev.* 227: 106–128.
- Fritz JH., Ferrero RL., Philpott DJ., Girardin SE. (2006).** Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nat Immunol.* 7: 1250–1257.
- Galletti R., Denoux C., Gambetta S., Dewdney J., Ausubel FM., De Lorenzo G., Ferrari S. (2008).** The AtrbohD-mediated oxidative burst elicited by oligogalacturonides in Arabidopsis is dispensable for the activation of defense responses effective against *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol.* 148(3) : 1695-706. doi: 10.1104/pp.108.127845.
- Galletti R., Ferrari S., De Lorenzo G. (2011).** Arabidopsis MPK3 and MPK6 play different roles in basal and oligogalacturonide- or flagellin-induced resistance against *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol.* 157(2) : 804-14. doi: 10.1104/pp.111.174003.
- Gao M., Showalter AM. (1999).** Yariv reagent treatment induces programmed cell death in Arabidopsis cell cultures and implicates arabinogalactan-protein involvement. *The Plant J.* 19 : 321-331.
- Gao M., Showalter AM. (2000).** Immunolocalization of LeAGP-1, a modular arabinogalactan-protein, reveals its developmentally regulated expression in tomato. *Planta.* 210 (6) : 865-74.
- Gaspar YM., Nam J., Schultz CJ., Lee LY., Gilson PR., Gelvin SB., Bacic A. (2004).** Characterization of the arabidopsis lysine-rich arabinogalactan-protein AtAGP17 mutant (rat1) that results in a decreased efficiency of agrobacterium transformation. *Plant Physiol.* 135 : 2162–71.
- Gens JS., Fujiki M., Pickard BG. (2000).** Arabinogalactan protein and wall-associated kinase in a plasmalemmal reticulum with specialized vertices. *Protoplasma.* 212 : 115–34.
- Gomez LD, Steele-King CG, McQueen-Mason SJ. (2008).** Sustainable liquid biofuels from biomass: the writing's on the walls. *New Phytol.* 178(3) : 473-85.
- Griffin GJ., Hale MG., Shay FJ. (1975).** Nature and quantity of sloughed organic matter produced by roots of axenic peanut plants. *Soil Biol Biochem.* 8 : 29–32.
- Groot EP., Doyle JA., Nichol SA., Rost TL. (2004).** Phylogenetic distribution and evolution of root apical meristem organization in dicotyledonous angiosperms. *Int J Plant Sci.* 165 (1) : 97-105.
- Guan Y., Nothnagel EA. (2004).** Binding of arabinogalactan proteins by Yariv phenylglycoside triggers wound-like responses in Arabidopsis cell cultures. *Plant Physiol.* 135 : 1346–1366.
- Gunawardena U., Rodriguez M., Straney D., Romeo JT., VanEtten HD., Hawes MC. (2005).** Tissue specific localization of root infection by *Nectria haematococca*: mechanisms and consequences. *Plant Physiol.* 137 : 1363–1374.
- Hahn MG., Darvill AG., Albersheim P. (1981).** Host–pathogen interactions. XIX. The endogenous elicitor, a fragment of a plant cell wall polysaccharide that elicits phytoalexin accumulation in soybeans. *Plant Physiol.* 68 : 1161–1169.
- Hamamoto L., Hawes MC., Rost TL. (2006).** The production and release of living root cap border cells is a function of root apical meristem type in dicotyledonous angiosperm plants. *Ann Bot.* 97 : 917-923.
- Handford MG., Sicilia F., Brandizzi F., Chung JH., Dupree P. (2004).** Arabidopsis thaliana expresses multiple Golgi-localised nucleotide-sugar transporters related to GONST1. *Mol Genet Genomics.* 272 (4) :397-410.
- Harholt J., Jensen JK., Sørensen SO., Orfila C., Pauly M., Scheller HV. (2006).** ARABINAN DEFICIENT 1 is a putative arabinosyltransferase involved in biosynthesis of pectic arabinan in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 140 : 49–58.
- Harholt J., Jensen JK., Verhertbruggen Y., Søgaard C., Bernard S., Nafisi M., Poulsen CP., Geshi N., Sakuragi Y., Driouch A., Knox JP., Scheller HV. (2012).** ARAD proteins associated with pectic Arabinan biosynthesis form complexes when transiently overexpressed in planta. *Planta.* 236 : 115–28.

- Hawes C., Faye L., Satiat-Jeunemaitre B. (1996).** The Golgi apparatus and pathways of vesicle trafficking. In: Smallwood M, Knox P, Bowles D, eds. *Membranes: specialized functions in plants*. Oxford, UK: Bios Scientific Publishers, pp 337–365.
- Hawes MC., Bringham LA., Wen F., Woo HH., Zhu Y. (1998).** Function of root border cells in plant health: pioneers in the rhizosphere. *Ann Rev Phytopathol.* 36 : 311–327.
- Hawes MC., Gunawardena U., Miyasaka S., Zhao X. (2000).** The role of root border cells in plant defense. *Trends in Plant Science.* 5 : 128-133.
- Hawes MC., Curlango-Rivera G., Wen F., White GJ., Vanetten HD., Xiong Z. (2011).** Extracellular DNA: the tip of root defenses. *Plant Sci.* 180 : 741–745.
- Hawes MC., Curlango-Rivera G., Xiong Z., Kessler JO. (2012).** Roles of root border cells in plant defense and regulation of rhizosphere microbial populations by extracellular DNA 'trapping'. *Plant Soil.* 355 : 1-15.
- Henry G., Thonart P., Ongena M. (2012).** PAMPs, MAMPs, DAMPs and others: an update on the diversity of plant immunity elicitors. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 16(2) : 257-268.
- Hong JK., Hwang BK., Kim CH. (1999).** Induction of local and systemic resistance to *Colletotrichum coccodes* in pepper plants by DL-beta-amino-n-butyric acid. *J. Phytopathol.* 147 : 193-198.
- Iijima, M., Griffith, B., Bengough, AG., (2000).** Sloughing of cap cells and carbon exudation from maize seedling roots in compacted sand. *New Phytologist.* 145 : 477–482.
- Iijima M., Higuchia T., Watanabea A., Bengough AG. (2004).** Method to quantify root border cells in sandy soil. *Soil Biology and Biochemistry.* 36 : 1517–1519.
- Johnson KL., Jones BJ., Bacic A., Schultz CJ. (2003).** The fasciclin-like arabinogalactan proteins of *Arabidopsis*. A multigene family of putative cell adhesion molecules. *Plant Physiol.* 133 : 1911-1925.
- Jones JD., and Dangl JL. (2006).** The plant immune system. *Nature.* 444 : 323-329.
- Jones L., Seymour GB., Knox JP. (1997).** Localization of pectic galactan in tomato cell walls using a monoclonal antibody specific to (1-4)- β -D-galactan. *Plant Physiol.* 113 : 1405–1412.
- Jürgens G. (2004).** Membrane trafficking in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 20 : 481-504.
- Kang BH., Staehelin LA. (2008).** ER-to-Golgi transport by COPII vesicles in *Arabidopsis* involves a ribosome-excluding scaffold that is transferred with the vesicles to the Golgi matrix. *Protoplasma.* 234(1-4) :51-64.
- Képès F., Rambourg A., Satiat-Jeunemaitre B. (2005).** Morphodynamics of the secretory pathway. *Int Rev Cytol.* 242 : 55-120.
- Kitazawa K., Tryfona T., Yoshimi Y., Hayashi Y., Kawachi S., Antonov L., Tanaka H., Takahashi T., Kaneko S., Dupree P., Tsumuraya Y., Kotake T. (2013).** β -Galactosyl Yariv reagent binds to the β -1,3-galactan of arabinogalactan proteins. *Plant Physiol.* 161 : 1117–1126.
- Konishi T., Takeda T., Miyazaki Y., Ohnishi-Kameyama M., Hayashi T., O'Neill MA., Ishii T. (2007).** A plant mutase that interconverts UDP-arabinofuranose and UDP-arabinopyranose. *Glycobiology.* 17 : 345–354.
- Krishnan N., Dickman MB., Becker DF. (2008).** Proline modulates the intracellular redox environment and protects mammalian cells against oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 44(4) : 671-81.
- Kristiansen KA., Jensen PE., Møller IM., Schulz A. (2009).** Monitoring reactive oxygen species formation and localisation in living cells by use of the fluorescent probe CM-H(2)DCFDA and confocal laser microscopy. *Physiol Plant.* 136 (4) : 369-83.
- Lai Y., Cogen AL., Radek KA., Park HJ., Macleod DT., Leichtle A., Ryan AF., Di Nardo A., Gallo RL. (2010).** Activation of TLR2 by a small molecule produced by *Staphylococcus epidermidis* increases antimicrobial defense against bacterial skin infections. *J Invest Dermatol.* 130 : 2211–2221.

- Langeveld SM., Vennik M., Kottenhagen M., Van Wijk R., Buijk A., Kijne JW., de Pater S. (2002).** Glucosylation activity and complex formation of two classes of reversibly glycosylated polypeptides. *Plant Physiol.* 129 (1) :278-89.
- Lugtenberg BJ., Kamilova F. (2009).** Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu.Rev.Microbiol.* 63 : 541–556.
- Madson M., Dunand C., Li X., Verma R., Vanzin GF., Caplan J., Shoue DA., Carpita NC., Reiter WD. (2003).** The MUR3 gene of Arabidopsis encode a xyloglucan galactosyltransferase that is evolutionarily related to animal exostosins. *Plant Cell.* 15 : 1662–1670.
- Maekawa T., Kufer TA., Schulze-Lefert P. (2011).** NLR functions in plant and animal immune systems: so far and yet so close. *Nat Immunol.* 12 (9) : 817-26.
- Mayhew TM., Lucocq JM., Griffiths G. (2002).** Relative labelling index: a novel stereological approach to test for non-random immunogold labeling of organelles and membranes on transmission electron microscopy thin sections. *J. Microsc.* 205 : 153–164.
- Mayhew TM (2011).** Mapping the distributions and quantifying the labelling intensities of cell compartments by immunoelectron microscopy: progress towards a coherent set of methods. *J Anat.* 219(6) :647-60.
- Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., Janeway, CA. Jr (1997).** A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature.* 388 : 394–397.
- Mollet JC., Kim S., Jauh GY., Lord EM. (2002).** Arabinogalactan proteins, pollen tube growth, and the reversible effects of Yariv phenylglycoside. *Protoplasma.* 219(1-2) :89-98.
- Moore JP., Nguema-Ona E., Chevalier L., Lindsey GG., Brandt WF., Lerouge P., Farrant JM., Driouich A. (2006).** Response of the leaf cell wall to desiccation in the resurrection plant *Myrothamnus flabellifolia*. *Plant Physiol.* 141 : 651–662.
- Mouille G., Ralet MC., Cavelier C., Eland C., Effroy D., Hématy K., McCartney L., Truong HN., Gaudon V., Thibault JF., Marchant A., Höfte H. (2007).** Homogalacturonan synthesis in *Arabidopsis thaliana* requires a Golgi-localized protein with a putative methyltransferase domain. *Plant J.* 5 : 605–614.
- Nakano A., Luini A. (2010).** Passage through the Golgi. *Curr Opin Cell Biol.* 22(4) : 471-8.
- Nebenführ A., Gallagher LA., Dunahay TG., Frohlick JA., Mazurkiewicz AM., Meehl JB., Staehelin LA. (1999).** Stop-and-go movements of plant Golgi stacks are mediated by the acto-myosin system. *Plant Physiol.* 121 :1127–1141.
- Nebenführ A., Staehelin LA. (2001).** Mobile factories: Golgi dynamics in plant cells. *Trends Plant Sci.* 6(4) :160-7.
- Nebenführ A. (2003).** Intra-Golgi transport: escalator or bucket brigade? In DG Robinson, ed, The Golgi Apparatus and the Plant Secretory Pathway, Vol 9. Blackwell Publishing, Oxford, pp 76–89.
- Nestle FO., Di Meglio P., Qin JZ., Nickoloff BJ. (2009).** Skin immune sentinels in health and disease. *Nat Rev Immun.* 9 : 679–691.
- Nguema-Ona E., Andème-Onzighi C., Aboughe-Angone S., Bardor M., Ishii T., Lerouge P., Driouich A. (2006).** The reb1-1 mutation of Arabidopsis. Effect on the structure and localization of galactose containing cell wall polysaccharides. *Plant Physiol.* 140 : 1406–1417.
- Nguema-Ona E., Bannigan A., Chevalier L., Baskin TI., Driouich A. (2007).** Disruption of arabinogalactan proteins disorganizes cortical microtubules in the root of Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal.* 52 : 240-251.
- Nguema-Ona E., Coimbra S., Vitré-Gibouin M., Mollet JC., Driouich A. (2012).** Arabinogalactan proteins in root and pollen tubes: distribution and functional aspects. *Ann. Bot.* 110 : 383–404.
- Nguema-Ona E., Vitré-Gibouin M., Cannesan MA., Driouich A. (2013).** Arabinogalactan proteins in root-microbe interactions. *Trends Plant Sci.* doi: 10.1016/j.tplants.2013.03.006.
- Nühse TS. (2012).** Cell wall integrity signaling and innate immunity in plants. *Frontiers in Plant Science* 3, 280.

- Ogawa M., Kay P., Wilson S., Swain SM. (2009).** Arabidopsis dehiscence zone polygalacturonase 1 (adpg1), adpg2, and quartet2 are polygalacturonases required for cell separation during reproductive development in Arabidopsis. *Plant Cell*. 21 :216–33.
- O'Neill MA., Ishii T., Albersheim P., Darvill AG. (2004).** Rhamnogalacturonan II : structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. *Annu Rev Plant Biol*. 55 : 109–139.
- Orozco-Cardenas M., Ryan CA. (1999).** Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin *via* the octadecanoid pathway. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96 : 6553–6655.
- Osterrieder A. (2012).** Tales of tethers and tentacles: golgins in plants. *J Microsc.* 247(1) : 68-77.
- Pastore S., Mascia F., Mariani V., Girolomoni G. (2008).** The epidermal growth factor receptor system in skin repair and inflammation. *J. Invest. Dermatol.* 128(6) : 1365-74.
- Pattathil S., Harper AD., Bar-Peled M. (2005).** Biosynthesis of UDP-xylose: characterization of membrane-bound AtUxs2. *Planta*. 221(4):538-48.
- Pattathil S., Avci U., Baldwin D., Swennes AG., McGill JA., Popper Z., Bootten T., Albert A., Davis RH., Chennareddy C., Dong R., O'Shea B., Rossi R., Loeff C., Freshour G., Narra R., O'Neil M., York WS., Hahn MG. (2010).** A comprehensive toolkit of plant cell wall glycan-directed monoclonal antibodies. *Plant Physiol*. 153(2) : 514-25.
- Pearce G., Strydom D., Johnson S., Ryan CA. (1991).** A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. *Science*. 253 (5022) : 895-7.
- Pearce G., Bhattacharya R., Chen YC. (2011).** Peptide signals for plant defense display a more universal role. *Plant Signal Behav.* 3 (12) : 1091-2.
- Pena MJ., Ryden P., Madson M., Smith AC., Carpita NC. (2004).** The galactose residues of xyloglucan are essential to maintain mechanical strength of the primary cell walls in Arabidopsis during growth. *Plant Physiol*. 134 : 443–451.
- Pérez S., Rodríguez-Carvajal MA., Doco T. (2003).** A complex plant cell wall polysaccharide : rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function. *Biochimie*. 85, 109–121.
- Perrin RM., DeRocher AE., Bar-Peled M., Zeng W., Norambuena L., Orellana A., Raikhel NV., Keegstra K. (1999).** Xyloglucan fucosyltransferase, an enzyme involved in plant cell wall biosynthesis. *Science*. 284 : 1976–1979.
- Ralet MC., Tranquet O., Poulain D., Moïse A., Guillon F. (2010).** Monoclonal antibodies to rhamnogalacturonan I backbone. *Planta*. 231(6) :1373-83.
- Rautengarten C., Ebert B., Herter T., Petzold CJ., Ishii T., Mukhopadhyay A., Usadel B., Scheller HV. (2011).** The interconversion of UDP-arabinopyranose and UDP-arabinofuranose is indispensable for plant development in Arabidopsis. *Plant Cell*. 23 : 1373–1390.
- Ravelojaona V., Robert AM., Robert L. (2008).** Expression of senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-Gal) by human skin fibroblasts, effect of advanced glycation end-products and fucose or rhamnose-rich polysaccharides. *Arch Gerontol Geriatr*. 48 : 151–154.
- Ray PM. (1980).** Cooperative action of beta-glucan synthetase and UDP-xylose xylosyltransferase of Golgi membranes in the synthesis of xyloglucan-like polysaccharide. *Biochim. Biophys.Acta*. 629 : 431–444.
- Reiter WD. (2008).** Biochemical genetics of nucleotide sugar interconversion reactions. *Curr.Opin.Plant Biol*. 11: 236–243.
- Richter S, Voss U, Jürgens G (2009).** Post-Golgi traffic in plants. *Traffic*. 10 : 819–828.
- Ridley BL., O'Neill MA., Mohnen D. (2001).** Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*. 57 : 929–967.
- Rock FL., Hardiman G., Timans JC., Kastelein RA., Bazan JF. (1998).** A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95 : 588–593.

- Savatin DV., Ferrari S., Sicilia F., De Lorenzo G. (2011).** Oligogalacturonide-auxin antagonism does not require posttranscriptional gene silencing or stabilization of auxin response repressors in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 157(3) : 1163-74.
- Scheller HV., Jensen JK., Sørensen SO., Harholt J., Geshi N. (2007).** Biosynthesis of pectin. *Physiol. Plant.* 129: 283–295.
- Scheller HV, Ulvskov P (2010).** Hemicelluloses. *Annu Rev Plant Biol.* 61 :263-89.
- Schultz CJ., Johnson KL., Currie G., Bacic A.(2000).** The classical arabinogalactan protein gene family of Arabidopsis. *Plant Cell.* 12.: 1751-1768.
- Schultz CJ., Rumsewicz MP., Johnson KL., Jones BJ., Gaspar YM., Bacic A. (2002).** Using genomic resources to guide research directions. The arabinogalactan protein gene family as a test case. *Plant Physiol.* 129 : 1448-1463.
- Seifert GJ. (2004).** Nucleotide sugar interconversions and cell wall biosynthesis: how to bring the inside . to the outside. *Curr.Opin.Plant Biol.* 7 : 277–284.
- Seifert GJ., Roberts K. (2007).** The biology of arabinogalactan proteins. *Annu Rev Plant Biol.* 58 : 137-61.
- Serpe MD., Nothnagel EA. (1994).** Effects of Yariv phenylglycosides on rosa cell-suspensions-evidence for the involvement of arabinogalactan-proteins in cell proliferation. *Planta.* 193 : 542–550.
- Showalter AM. (2001).** Arabinogalactan proteins: structure, expression and function. *Cell. Mol. Life Sci.* 58 : 1399–1417.
- Smith LG. (2001).** Plant cell division : building walls in the right places. *Nature reviews, Molecular Cell Biology.* 2 : 33-39.
- Søgaard C., Stenbæk A., Bernard S., Hadi M., Driouch A., Scheller HV., Sakuragi Y. (2012).** GO-PROMTO illuminates protein membrane topologies of glycan biosynthetic enzymes in the Golgi apparatus of living tissues. *PLoS One.* 7 (2):e31324. doi: 10.1371/journal.pone.0031324.
- Sparkes I., Runions J., Hawes C., Griffing L. (2009).** Movement and remodeling of the endoplasmic reticulum in nondividing cells of tobacco leaves. *Plant Cell.* 21(12) : 3937-49.
- Sparkes I., Brandizzi F. (2012).** Fluorescent protein-based technologies: shedding new light on the plant endomembrane system.*Plant J.* 70(1) : 96-107.
- Spiro MD., Ridley BL., Eberhard S., Kates KA., Mathieu Y., O'Neill MA., Mohnen D., Guern J., Darvill A., Albersheim P. (1998).** Biological activity of reducing-end-derivatized oligogalacturonides in tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.* 116(4) : 1289-98.
- Spiro MD., Bowers JF., Cosgrove DJ. (2002).** A comparison of oligogalacturonide and auxin-induced extracellular alkalinization and growth responses in roots of intact cucumber seedlings. *Plant Physiol.* 130 : 895–903.
- Staehelein LA., Giddings TH. Jr, Kiss JZ., Sack FD. (1990).** Macromolecular differentiation of Golgi stacks in root tips of Arabidopsis and Nicotiana seedlings as visualized in high pressure frozen and freeze-substituted samples. *Protoplasma.* 157 : 75–91.
- Staehelein LA., Moore I. (1995).** The plant Golgi apparatus: Structure functional organization and trafficking mechanisms. *Annals review of plant physiology and plant molecular biology.* 46 : 261-288.
- Thibault JF., Renard CM., Axelos MAV., Roger P., Crépeau MJ. (1993).** Studies of the length of homogalacturonic regions in pectins by acid hydrolysis. *Carbohy Res.* 238 : 271–286.
- Vacheron J., Desbrosses G., Bouffaud ML., Touraine B., Moëgne-Loccoz Y., Muller D., Legendre L., Wisniewski-Dyé F., Prigent-Combaret C. (2013).** Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Front Plant Sci.* 4 :3 56.
- Vanholme R, Morreel K, Darrah C, Oyarce P, Grabber JH, Ralph J, Boerjan W. (2012).** Metabolic engineering of novel lignin in biomass crops. *New Phytol.* 196(4) : 978-1000.

- Vanzin GF., Madson M., Carpita NC., Raikhel NV., Keegstra K., Reiter WD. (2002).** The mur2 mutant of *Arabidopsis thaliana* lacks fucosylated xyloglucan because of a lesion in fucosyltransferase AtFUT1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 99 : 3340–3345.
- Verhertbruggen Y., Marcus SE., Haeger A., Verhoef R., Schols HA., McCleary BV., McKee L., Gilbert HJ., Knox JP. (2009).** Developmental complexity of arabinan polysaccharides and their processing in plant cell walls. *Plant J.* 59 (3) : 413-25.
- Verica JA., Chae L., Tong HY., Ingmire P., He ZH. (2003).** Tissue-specific and developmentally regulated expression of a cluster of tandemly arrayed cellwall-associated kinase-like genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 133 : 1732–1746.
- Vicré M., Jauneau A., Knox JP., Driouich A. (1998).** Immunolocalization of β -(1→4) and β -(1→6)-D-galactan epitopes in the cell wall and Golgi stacks of developing flax root tissues. *Protoplasma.* 203 : 26-34.
- Vicré M., Santaella C., Blanchet S., Gateau A., Driouich A. (2005).** Root border-like cells of *Arabidopsis*, microscopical characterization and role in the interaction with rhizobacteria. *Plant Physiol.* 138 : 998-1008.
- Viotti C, Bubeck J, Stierhof YD, Krebs M, Langhans M, van den Berg W, van Dongen W, Richter S, Geldner N, Takano J, Jürgens G, de Vries SC, Robinson DG, Schumacher K (2010).** Endocytic and secretory traffic in *Arabidopsis* merge in the trans-Golgi network/early endosome, an independent and highly dynamic organelle. *PlantCell.* 22 : 1344–1357.
- von Wirén, N., Römheld, V., Shioiri, T., Marschner, H. (1995).** Competition between microorganisms and roots of barley and sorghum for iron accumulated in the root apoplasm. *New Phytol.* 130 : 511–521.
- Walters DR., Ratsep J., Havis ND. (2013).** Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. *J Exp Bot.* 64(5) : 1263-80.
- Wen F., VanEtten HD., Tsapralis G., Hawes MC. (2007).** Extracellular proteins in pea root tip and border cell exudates. *Plant Physiol.* 143:773–783.
- Wen F., White GJ., VanEtten HD., Xiong Z., Hawes MC. (2009).** Extracellular DNA is required for root tip resistance to fungal infection. *Plant Physiol.* 151 : 820–829.
- Wen F., White GJ., Xiong Z., VanEtten HD., Hawes MC. (2009).** Extracellular DNA is required for root tip resistance to fungal infection. *Plant Physiol.* 151 : 820-829.
- Willats WGT., Marcus SE., Knox JP. (1998).** Generation of a monoclonal antibody specific to (1-5)- α -L-arabinan. *Carbohydr.Res.* 308 : 149–162.
- Worden N., Park E., Drakakaki GJ. (2012).** Trans-Golgi network: an intersection of trafficking cell wall components. *Integr Plant Biol.* 54(11) : 875-86.
- Xie F., Williams A., Edwards A., Downie JA. (2012).** A plant arabinogalactan-like glycoprotein promotes a novel type of polar surface attachment by *Rhizobium leguminosarum*. *Mol Plant Microbe Interact.* 25(2) : 250-8.
- Yamaguchi Y., Huffaker A. (2011).** Endogenous peptide elicitors in higher plants. *Curr Opin Plant Biol.* 14 (4) : 351-7.
- Yang D., Chertov O., Bykovskaia SN., Chen Q, Buffo MJ., Shogan J., Anderson M., Schröder JM., Wang JM., Howard OM., Oppenheim JJ. (1999).** Beta-defensins : linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science.* 286 : 525–528.
- Yang D., Biragyn A., Kwak LW., Oppenheim JJ. (2002).** Mammalian defensins in immunity : more than just microbicidal. *Trends Immunol.* 23 : 291–296.
- Yariv J., Lis H., Katchalski E. (1967).** Precipitation of arabic acid and some seed polysaccharides by glycosylphenylazo dyes. *Biochem. J.* 105 : 1C–2C.
- Zhang GF., Staehelin LA. (1992).** Functional compartmentation of the Golgi apparatus of plant cells: immunocytochemical analysis of highpressure frozen- and freeze-substituted sycamore maple suspension culture cells. *Plant Physiol.* 99 : 1070–1083.

- Zipfel C., and Felix G. (2005).** Plants and animals: a different taste for microbes? *Curr Opin Plant Biol.* 8 : 353-360.
- Zipfel C., Kunze G., Chinchilla D., Caniard A., Jones JD., Boller T., Felix G. (2006).** Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts Agrobacterium-mediated transformation. *Cell.* 125 : 749-760.
- Zippel J., Wells T., Hensel A. (2009).** Arabinogalactan protein from *Jatropha curcas* L. seeds as TGF β 1-mediated inducer of keratinocyte in vitro differentiation and stimulation of GM-CSF, HGF, KGF and in organotypic skin equivalents. *Fitoterapia.* 7 : 772-8.
- Zippel J., Wells T., Hensel A. (2010).** Arabinogalactan protein from *Jatropha curcas* L. seeds as TGF β 1-mediated inducer of keratinocyte in vitro differentiation and stimulation of GM-CSF, HGF, KGF and in organotypic skin equivalents. *Fitoterapia.* 81(7) : 772-8.
- Zvereva AS., Pooggin MM. (2012).** Silencing and innate immunity in plant defense against viral and non-viral pathogens. *Viruses.* 4(11) : 2578-97.

9 – Annexe 01 : principales publications

- ACL17**-Bernard S., Dardelle F., Lund C.H., Ramdani Y., Loutelier-Bourhis C., Sakuragi Y., Lerouge P., Driouich A., **Follet-Gueye ML**. The Golgi compartmentalization of rhamnogalacturonan I associated epitopes and enzymes potentially involved in arabinan biosynthesis in tobacco BY-2 suspension-cultured cells. *The Plant J*. Soumis le 18 Octobre 2013.
- ACL13**-Driouich A., **Follet-Gueye ML**, Vické-Gibouin M., Hawes M. Root border cells and secretions as critical elements in plant host defense. *Current Opinion in Plant Biology*. In press. *IF*, 9.2.
- ACL10**-Percoco G., Benard M., Ramdani Y., Lati E., Lefeuvre L., Driouich A., **Follet-Gueye ML**. (2012) Isolation of human epidermal layers by laser capture microdissection: application to the analysis of gene expression by quantitative real-time PCR. *Experimental Dermatology*. 21 : 531–534. *IF*, 3.543.
- ACL08**-Chevalier L., Bernard S., Ramdani Y., Lamour R., Bardor M., Lerouge P., **Follet-Gueye ML**, Driouich A. (2012) Subcompartment localization of the side chain xyloglucan-synthesizing enzymes within Golgi stacks of tobacco suspensio-cultured cells. *The Plant J*. 64 : 977-989. *IF*, 6.94.
- ACL05-Follet-Gueye ML.**, Pagny S., Faye L., Gomord V., Driouich A. (2003) An improved chemical fixation method suitable for immunogold localization of green fluorescent protein in the Golgi apparatus of tobacco Bright Yellow (BY-2) Cells. *J. Histochem. Cytochem.* 51 : 931-940. *IF*, 2.725.
- OS04-Follet-Gueye ML.**, Mollet JC., Vické-Gibouin M., Bernard S., Chevalier L., Plancot B., Dardelle F., Ramdani Y, Coimbra S., Driouich A. (2012) Immuno-Glyco-Imaging in Plant Cells: Localization of Cell Wall Carbohydrate Epitopes and Their Biosynthesizing Enzymes. In *Applications of Immunocytochemistry*. Ed. Hesam Dehghani ISBN 978-953-51-0229-8. pp 297-320.

**THE GOLGI COMPARTMENTALIZATION OF
RHAMNOGALACTURONAN I ASSOCIATED EPITOPES AND
ENZYMES POTENTIALLY INVOLVED IN ARABINAN
BIOSYNTHESIS IN TOBACCO BY-2 SUSPENSION-CULTURED
CELLS**



Journal:	<i>The Plant Journal</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Bernard, Sophie; University of Rouen, UPRES A 4358 GlycoMEV Laboratory Have Lund, Christian; University of Copenhagen, Faculty of Science, Department of Plant and Environmental sciences Dardelle, Flavien; Fitoplancton Marino, S.L., Dársena Comercial S/N Ramdani, Yasmina; University of Rouen, Laboratoire Inserm-ERI28, NeoVasc Loutelier-Bourhis, Corinne; University of Rouen, CNRS-UMR6614, IRCOF- COBRA Lerouge, Patrice; University of Rouen, UPRES A 4358 GlycoMEV Laboratory Sakuragi, Yumiko; University of Copenhagen, Faculty of Science, Department of Plant and Environmental sciences Driouich, Azeddine; University of Rouen, UPRES A 4358 GlycoMEV Laboratory Follet-Gueye, Marie-Laure; University of Rouen, UPRES A 4358 GlycoMEV Laboratory
Key Words:	Rhamnogalacturonan I, Arabinan, Cell wall, Golgi, Quantitative immunogold, Electron microscopy, High Pressure Freezing

SCHOLARONE™
Manuscripts

SUBMITTED MANUSCRIPT

THE GOLGI COMPARTMENTALIZATION OF RHAMNOGALACTURONAN I ASSOCIATED EPITOPES AND ENZYMES POTENTIALLY INVOLVED IN ARABINAN BIOSYNTHESIS IN TOBACCO BY-2 SUSPENSION-CULTURED CELLS

Sophie Bernard¹, Christian Have Lund², Flavien Dardelle³, Yasmina Ramdani⁴, Corinne Loutelier-Bourhis⁵, Patrice Lerouge¹, Yumiko Sakuragi², Azeddine Driouich*¹ and Marie-Laure Follet-Gueye*¹.

*cosupervision of the study

¹Glycobiology and Plant Extracellular Matrix laboratory-EA4358, Institute for Cell Imaging Research Platform of Normandy (PRIMACEN), Institut of Research and Innovation in Biomedecine (IRIB), Faculty of Science, Rouen University, France

²University of Copenhagen, Faculty of Science, Department of Plant and Environmental sciences, Thorvaldsensvej 40, Frederiksberg DK-1871, Denmark

³Fitoplancton Marino, S.L., Dársena Comercial S/N, 11500 El Puerto de Santa María (Cádiz), Spain

⁴Laboratoire Inserm-ERI28, NeoVasc, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université de Rouen, 22, Boulevard Gambetta, 76183 Rouen Cedex

⁵Laboratoire CNRS-UMR6614, COBRA, Institut de Recherche en Chimie Organique Fine (IRCOF), Faculté des Sciences, Université de Rouen, Rue Tesnière, 76130 Mont Saint Aignan

RUNNING TITLE

Compartmentalization of RG-I synthesis within plant Golgi.

KEY WORDS

Rhamnogalacturonan I, Arabinan, Cell wall, Golgi, Quantitative immunogold, Electron microscopy, High Pressure Freezing

SUMMARY (240 words)

Pectins are cell wall complex polysaccharides that play a central role in plant development. Rhamnogalacturonan I (RG-I), is a structurally heterogeneous pectic polysaccharide that consists of a rhamnogalacturonan backbone substituted with galactan, arabinan and arabinogalactan side chains. RG-I has been implicated in numerous cell wall properties. Like other complex polysaccharides, RG-I is synthesized within Golgi stacks before its transport to the cell wall. To gain more understanding on the spatial organization of RG-I assembly pathway within Golgi cisternae, we apply here a quantitative immunogold analysis using transmission electron microscopy on high pressure frozen and freeze substituted wild-type tobacco (*Nicotiana tabacum*) BY-2 suspension cultured-cells. We present a detailed Golgi mapping of major sugar epitopes associated with RG-I by using specific monoclonal antibodies. We also establish the Golgi compartmentalization of three enzymes potentially involved in the biosynthesis of RG-I, namely the arabinan α -1,5-arabinosyltransferase, AtARAD1 (arabinan deficient 1), two UDP-xylose 4- epimerases, AtUXE1/MURUS4 and AtUXE3. These enzymes have been fused to green-fluorescent protein (GFP) and stably expressed in tobacco cells. The data demonstrate that sugar motifs associated with RG-I backbone are preferentially present in the medial Golgi cisternae whereas linear unbranched arabinan chains are located to the trans cisternae and the ramified arabinan, galactan or arabinogalactan are mapped to *trans*-Golgi network. Finally, the fused proteins AtARAD1-GFP and AtUXE3-GFP are detected in the medial Golgi cisternae suggesting their possible cooperative action during the biosynthesis of the arabinose-containing cell wall polymers such as RG-I.

INTRODUCTION (930 words)

Pectins are major polysaccharides of the primary cell wall. They consist of structurally complex and heterogeneous polysaccharides with galacturonic acid (GalUA) residues. The most abundant pectin is homogalacturonan (HG), a linear homopolymer of (1→4)- α -linked GalUA which can be methyl-esterified and/or acetylated (Willats *et al.*, 2001; Vincken *et al.*, 2003; Knox, 2008). More complex in structure are the three other major pectic polysaccharides: xylogalacturonan (XGA), rhamnogalacturonan-II (RG-II) and rhamnogalacturonan-I (RG-I).

The RG-I represents 20-35% of pectin and is the most structurally variable pectic compound. It consists of a disaccharide repeat of [-4- α -D-GalUA-(1→2)- α -L-Rha-(1-)]_n backbone. Between 20 and 80% of the backbone rhamnosyl residues are substituted and the side chain composition varies depending on plant species, tissues and developmental stage (Albersheim, 1996; Freshour *et al.*, 1996; Willats *et al.*, 2001; Guillemin *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2013). Oligosaccharide side chains of RG-I consist predominantly of galactan, arabinan and arabinogalactan (AG) (Vincken *et al.*, 2003; Mohnen, 2008; Atmodjo *et al.*, 2013). Galactans are mostly linear chains of (1→4)- β -D-galactopyranose (Galp) residues, whereas arabinans are chains of (1→5)- α -L-arabinofuranose (Araf) that are frequently branched. In certain plant species, galactan and arabinan side chains could be substituted with terminal phenolic esters which can dimerize oxidatively to form links between polymers (Ralet *et al.*, 2005). Several AG side chains of RG-I have been identified. Type I AG is composed of a linear (1→4)- β -D-galactan chains branched with single α -L-Araf units at position O-3 of the galactosyl units or other sugars such as fucose and glucuronic acid (Ridley *et al.*, 2001; Nakamura *et al.*, 2002; Øbro *et al.*, 2004). The presence of type II AG in RG-I, that consists of an (1→3)- α -D-galactan backbone substituted by short (1→6)- β -D-galactan chains branched with Araf, rhamnose and glucuronic acid and terminated by α -L-Araf, has also been reported (Mohnen, 2008; Verhoef *et al.*, 2009). Other types of arabinogalactan side chains of RG-I have been described consisting of galactosyl residues or short sequence of galactosyl residues between branched arabinan chains and the backbone (Schols *et al.*, 1990; Sakamoto and Sakai, 1995; Huisman *et al.*, 2001).

Pectic polysaccharides of the cell wall are assumed to be synthesized in the Golgi apparatus (Zhang and Staehelin, 1992; Mohnen, 2008; Driouich *et al.*, 2012) *via* the combined action of Golgi glycosyltransferases (GTs), nucleotide-sugar transporters (NSTs) and nucleotide-sugar interconversion enzymes (NIEs) (Keegstra and Raikhel, 2001; Seifert, 2004; Reiter, 2008; Reyes and Orellana, 2008). As compared to XyG, HG and RG-II biosynthesis, relatively little is known about the GTs involved in RG-I biosynthesis. Caffall and Mohnen (2009) postulated that 34 specific GTs activities may be required. None of the enzymes involved in the RG-I backbone assembly have been identified. The characterization of galactosyltransferase activity necessary for RG-I (1→4)- β -D-galactan chains biosynthesis was carried out in Golgi-membrane fractions from several eudicotyledonous plants (Goubet *et al.*, 1993; Brickell and Reid, 1996; Geshi *et al.*, 2000; Kato *et al.*, 2003; Konishi *et al.*, 2004). Recently, Liwanag *et al.* (2012) demonstrated that the Arabidopsis galactan synthase 1 (AtGALS1) of GT92 family, is a β (1-4) galactan β (1-4) galactosyltransferase. Two putative arabinan arabinosyltransferases, AtARAD1 and AtARAD2, belonging to the GT47 family, have been identified (Harholt *et al.*, 2006; 2012). While pyranose ring is the utmost arabinose configuration found in plants, pectic arabinan incorporates UDP-L-arabinofuranose. An UDP-arabinose mutase (UAM) that converts UDP-arabinopyranose into UDP-arabinofuranose was characterized in rice (Konishi *et al.*, 2007) and found to share more than 80% identity with the reversibly glycosylated proteins (RGPs) of Arabidopsis (Dhugga *et al.*, 1991, 1997; Delgado *et al.*, 1998; De Pino *et al.*, 2007). The arabinose mutase activity has been recently shown for three (AtRGP1, 2 and 3) of the five isoforms of RGPs identified in the Arabidopsis genome (Rautengarten *et al.*, 2011). Moreover, severe developmental phenotypes associated with subsequent reduction in cell wall arabinose content in homozygous T-DNA insertion *rgp1-1* and *rgp1-2* mutants have been observed, suggesting that RGPs could be involved in the biosynthesis of the arabinose-enriched cell wall polymers such as RG-I or AGPs.

RG-I biosynthesis in the Golgi apparatus requires cooperation between glycosyltransferases, nucleotide-sugar interconversion enzymes (NIEs) and potentially nucleotide-sugar transporters (NSTs). Actually, few NST have been functionally characterized (Baldwin *et al.*, 2001; Norambuena *et al.*, 2005; Handford *et al.*, 2012). Five UDP-D-glucose-4-epimerases (UGEs) have been identified in *Arabidopsis thaliana*. Whereas AtUGE4 was shown to be involved in AGPs and XyG galactosylation (Seifert *et al.*, 2002; Nguema-Ona *et al.*, 2006), other UGE isoforms are less selective and could contribute to RG-I galactosylation (Rösti *et al.*, 2007). A Golgi-localized UDP-D-xylose-4-epimerase, AtUXE1/MUR4, has been characterized in Arabidopsis (Burget *et al.*, 1999; 2003). The authors have

shown that the *mur4* mutant contains 50% of wild-type levels of cell wall arabinose affecting both pectic polysaccharides and AGPs.

To date, the spatial organization of RG-I assembly pathway within the plant Golgi stacks is not fully understood. Immuno-electron microscopical analyses using antibodies directed against specific sugar, Golgi enzyme or Golgi tagged-enzyme epitopes is a reliable method for investigating the compartmentalization of cell wall complex polysaccharide biosynthesis within Golgi cisternae (Zhang and Staehelin, 1992; Vicré *et al.*, 1998; Chevalier *et al.*, 2010; Follet-Gueye *et al.*, 2012; Driouich *et al.*, 2012).

To complete the knowledge with respect to RG-I assembly in the Golgi apparatus, we established the first immunogold quantitative analysis of epitopes associated to RG-I backbone, arabinan, galactan and arabinogalactan side chains, in tobacco BY-2 suspension cultured-cells. In addition, we investigated the Golgi compartmentalization of the xylose epimerase AtUXE1/MUR4 and its homolog AtUXE3, and a putative arabinan arabinosyltransferase (AtARAD1) in cells expressing AtARAD1-GFP, AtUXE1-GFP or AtUXE3-GFP. Finally, we tested if AtARAD1 and AtUXE3 were involved in a proteins complex with the mutases AtRGP1 and AtRGP2.

RESULTS (1984 words)

Structural analysis of Rhamnogalacturonan- I isolated from tobacco BY-2 suspension-cultured cells

The monosaccharide composition and sugar linkages of RG-I from tobacco cells were determined on a pectin-enriched fraction isolated from the whole cell wall of BY-2 suspension-cultured cells using hot 0.5% oxalate ammonium. The four main monosaccharides (Table 1a), representing 88% of the total sugar composition, were arabinose (Ara), galacturonic acid (GalUA), rhamnose (Rha) and galactose (Gal) consistent with previous data (Eda *et al.*, 1983).

Rha (18.0%) and GalUA (20.8%) are in a ratio close to 1 and can be attributed to the (4- α -D-GalUA_{p1}→2- α -L-Rhap₁) repeating unit of the backbone of the RG-I. Therefore, this pectic fraction is highly enriched in RG-I. Ara (38.8%) and Gal (11.8%), the main monosaccharides constitutive of the RG-I side chains (Scheller *et al.*, 2007; Mohnen, 2008), represent about the half of the total sugars. The pectin-enriched fraction also contains low amount of xylose, suggesting the presence of XyG or XGA probably co-extracted with RG-I or linked to the pectins (Popper and Fry, 2005, Marcus *et al.*, 2008). Mannose, glucuronic acid, glucose and galactose could possibly originate from residual arabinoglucuronomannan (Mori and Kato 1981), or galactoglucomannan as it has been described in *Nicotiana tabacum* (Eda *et al.*, 1985) and *Nicotiana plumbaginifolia* (Sims *et al.*, 1997).

The sugar linkage analysis (Table 1b) shows the presence of 2-linked (3.2%) and 2,4-linked (3.6%) rhamnosyl residues in similar ratio indicating that ~50% of the RG-I backbone is substituted on C4 of the rhamnosyl residue. Linkage analysis of arabinosyl residues shows a high percentage of 5-Araf (22.9%) and a lower percentage of 3-Araf (1.9%), indicating most of the Araf residues are found in α (1-5) arabinan chains, and only a small proportion is found in α (1-3) arabinan chains. The presence of 3,5-Araf (15.7 %) suggests that α (1-5) arabinan chains are highly substituted (around 40%). The presence of T-Araf (T, terminal) (14.3%) reinforces this observation and suggests that substitutions are with single Araf residues and with short secondary chains of α (1-5) arabinan and a minor part of α (1-3) arabinan. As for the galactose residues, these are mainly 4-Galp (7.5%) and 3-Galp (3.9%), reflecting the presence of β (1-4) and β (1-3) galactan chains, and a small proportion found in β (1-6) galactan chain. Given the percentage of 4,6-Galp (1.2%) and 3,6-Galp (0.8%) substitutions, around 14% of β (1-4) galactan chains and 17% of β (1-3) galactan chains are substituted at position O-6 of galactosyl unit. Other substitution types were not detected. The presence of contaminating xyloglucan in the BY-2 pectin-enriched fraction was confirmed by the identification of T-Xyl_p, 2-Xyl_p and 4,6-Glc_p in the sugar linkage analysis. The xyloglucan contamination in the pectin fraction most likely co-purified because of covalent linkages between xyloglucan and RG-I which have been reported to occur in Arabidopsis, sycamore, rose, tomato, spinach, maize and barley in addition to tobacco (Popper and Fry 2005).

Taken together, these analyses indicate that the pectic fraction isolated from the cell wall of tobacco BY-2 suspension-cultured cells using hot 0.5% oxalate ammonium is highly enriched in RG-I. Its backbone consists of (4- α -D-GalUA_{p1} → 2- α -L-Rhap₁) repeating unit which is 50% substituted with branched arabinan, galactan, and arabinogalactan chains as possible side chains. These findings are

in agreement and confirm previous studies on RG-I structure of BY-2 suspension-cultured cells by (Eda *et al.*, 1983).

Subcellular localization of RG-I epitopes in tobacco cells

The RG-I epitopes recognized by the set of antibodies we used are summarized in Table 2. To investigate the subcellular localization of these different epitopes within tobacco BY-2 suspension-cultured cells, we prepared protoplasts that were immunolabelled using a secondary antibody coupled to FITC. Figure 1 shows a punctate pattern of fluorescence with INRA-RU1 (Fig.1A), INRA-RU2 (Fig.1B), LM5 (Fig.1C), LM6 (Fig.1D), LM13 (Fig.1E) and LM16 (Fig.1F) antibodies typical of that Golgi stack labelling in plant cells (Nebenführ *et al.*, 1999, Pagny *et al.*, 2003; Chevalier *et al.*, 2010).

Immunogold localization of RG-I epitopes in Golgi cisternae

We investigated the distribution of different pectic epitopes within Golgi cisternae using immunogold-electron microscopy on wild-type BY-2 suspension-cultured cells prepared by high pressure freezing (HPF), followed by freeze substitution (FS) technique. Figures 2A and 2B show immunogold-labelled Golgi stacks of wild-type tobacco BY-2 suspension-cultured cells. It is to note that the ultrastructural organization of the Golgi stacks is well-preserved allowing distinction of different Golgi subcompartments as described previously in Chevalier *et al.*, 2010 (Figure 2B).

Different labelling densities in Golgi stacks depending on the tested antibody were observed. LM6 and LM16 antibodies showed the strongest labelling density (Figures 2A and 2B), whereas INRA-RU1, LM5 and LM13 antibodies had a lower labelling density (Figures S1A, S1B and S1C respectively). Also, for LM13 epitopes, labelling of the cell wall was weaker than those observed with other sugar epitopes analyzed (data not shown). For INRA-RU2 antibody, we could not detect gold particles in Golgi stacks or in the cell wall, although fluorescence signals could be observed in Golgi stacks in protoplast (Figure 1B) and in cell walls of intact cells (Figure S2).

To start the statistical evaluation of the immunogold localization, we first checked the labelling specificity of different antibodies by using the immunolabelling condition without the primary antibody as control to do a chi-square test (χ^2). Our null hypothesis was: "there is a random distribution of gold particles with immunolabelling with primary antibody and immunolabelling without primary antibody". For each antibody, we counted gold particles in the 3 compartments (*cis*, medial, *trans*) and the *trans*-Golgi Network (TGN) of 35 to 55 Golgi stacks. For LM6, LM16 and LM5 antibodies, the total chi-squared values were 30.91, 17.36, and 11.32, respectively (Table 3a for LM6, Table S2a and S3a, for LM5 and LM16). Those values were compared to reference values in a contingency table, with a degree of freedom = 3 (see M&M), and showed that we rejected the null hypothesis with a risk $\alpha < 0.005$ for LM6 and LM16, and $\alpha < 0.015$ for LM5. For LM13 antibody, the total chi-squared was 4.35 (see Table S4a). In this case, we rejected the null hypothesis with a risk $\alpha \leq 0.1$. A chi-square test was not necessary for INRA-RU1 as we have no gold particle on more than 55 Golgi stacks on the control without the primary antibody.

Secondly, we investigated Golgi distribution of the pectic epitopes recognized by these antibodies in the 3 compartments (*cis*, medial, *trans*) and the TGN using the relative labelling index (RLI) as described in Chevalier *et al.*, (2010) and updated by Mayhew, (2011). According to Mayhew and Lucocq, (2008), RLI indicates the degree to which a compartment is preferentially labelled in comparison to the theoretical situation of random labelling considering the surface of each compartment. If RLI of the compartment is ≤ 1 , it means that it is randomly labelled. But if the compartment has $RLI > 1$ and its partial $\chi^2 > 10\%$, then it is preferentially labelled. Immunogold labelling of Golgi stacks of epitopes recognized by LM6 is illustrated in Figure 2A and Table 3b. Gold particles were found to be localized mainly over the TGN, as the $RLI = 1.75$ and $\chi^2 = 50.34\%$. Immunogold localization of epitopes recognized by the other antibodies are shown in supplemental data: for INRA-RU1 antibody, gold particles were mainly localized over medial Golgi cisternae (Figure S1A and Table S1), labelling of epitopes recognized by LM13 (Figure S1C and Table S4b) showed a localization in *trans* cisternae, whereas LM5 and LM16 epitopes (respectively Figures S1B and 2B; and Tables S2b and S3b) showed preferential localization in the TGN.

Subcellular localization of AtARAD1, AtUXE1 and AtUXE3 proteins fused to GFP

In addition to RG-I epitopes distribution within Golgi subcompartments, we first checked subcellular localization of the proteins potentially involved in RG-I synthesis by confocal microscopy. We focused on proteins that are good candidates for RG-I arabinan side chain synthesis: the putative arabinan arabinosyltransferase AtARAD1 (Harholt *et al.*, 2006), the proven xylose epimerase AtUXE1/MUR4

(Burget *et al.*, 2003) and one of its homologs AtUXE3. AtARAD1 and AtUXE1 are Golgi type II membrane-bound proteins. AtUXE3 is a homolog of AtUXE1 that seems to have no transmembrane domain or signal peptide according to *in silico* analysis of the coding sequence with Aramemnon (<http://aramemnon.uni-koeln.de/>) (data not shown).

As illustrated in Figure 3, transformed BY-2 suspension-cultured cells expressing AtARAD1-GFP (Figure 3A) and AtUXE3-GFP (Figure 3B) displayed fluorescent and mobile spots (of 1 μm in size) confirming Golgi localization. Interestingly, AtUXE3-GFP (Figure 3C) showed a similar fluorescence signal again consistent with Golgi localization, and no any additional fluorescence associated with cytosolic localization.

Immunogold localization of AtARAD1, AtUXE1 and AtUXE3 proteins fused to GFP within Golgi cisternae

The labelling specificity of the proteins in transformed BY-2 suspension-cultured cells compared to wild-type was confirmed with a chi-square test (χ^2). Our null hypothesis was that there is no difference of gold distribution between wild-type and transformed cells. We used the same procedure for immunogold localization of pectic epitopes (see above). For AtARAD1-GFP and AtUXE3-GFP, the total chi-squared values were 86.98 and 31.68 respectively (Table 4a and Table S5a), showing that with 3 degree of freedom the null hypothesis can be rejected with a risk $\alpha < 0.005$. For AtUXE1-GFP, the total chi-squared was 9.24 (Table S6a). In this case, we rejected the null hypothesis with a risk $\alpha < 0.03$.

Then, we investigated the Golgi distribution of these fusion proteins in the 3 sub-compartments (*cis*, medial, *trans*) and the TGN using the relative labelling index (RLI) as described earlier (Chevalier *et al.*, 2010). Based on RLI value and partial χ^2 value, we found that AtARAD1-GFP and AtUXE3-GFP are both preferentially localized within medial Golgi cisternae (Table 4b and S5b respectively). Finally, AtUXE1-GFP was found mostly in the TGN (Table S6b).

Arabinan RG-I biosynthesis: a search for Golgi protein complex

As the putative arabinosyltransferase AtARAD1 and AtUXE3, the homolog of the xylose epimerase AtUXE1, seemed to localize to the same Golgi subcompartment, we investigated whether these proteins interact and form a Golgi protein complex. Also, we tested if the arabinose mutases AtRGP1 and AtRGP2 (Rautengarten *et al.*, 2011) could be part of such a putative complex in the Golgi apparatus.

The proteins AtARAD1, AtUXE3, AtRGP1 and AtRGP2 were tested in a binary protein-protein interaction screen using the split ubiquitin yeast system, to clarify if any direct interaction occurs between them. A modified split ubiquitin system commercially available from Dualsystems Biotech AG was used because it allows fusion of the reporters at the N-termini of tested proteins. The proteins are fused to the C-terminal ubiquitin moiety (Cub) fused to a transcription factor and the N-terminal ubiquitin moiety (NubG). The fusion proteins are designated as bait and prey, respectively.

The data are presented Figure 5. Functionality of bait (Cub) tested against the positive control interaction partner Ost1-Nubl (Figure 5, lines 1 to 4) showed that all constructs were functional except for AtARAD1-Cub which did not produce any viable cell on the selection media and no blue color formation was observed in Xgal assay (Figure 5, line 1). Interaction specificity of baits and preys were tested against an empty vector control (pPR3-N) and AtXXT2, an Arabidopsis type-II transmembrane xylosyltransferase involved in xyloglucan biosynthesis, respectively (Figure 5, lines 5 to 12). No random interaction was detected with the empty vector nor with AtXXT2-Cub.

Binary interaction assay was carried out among the four proteins. The binary interaction test with AtRGP1 and AtRGP2 showed positive signals, when reciprocal tagging with Cub or NubG, for the two homodimers, AtRGP1-AtRGP1 (Figure 5, line 18) and AtRGP2-AtRGP2 (Figure 5, line 23), and the heterodimer AtRGP1-AtRGP2 (Figure 5, lines 19 and 22), confirming results of Rautengarten *et al.* (2011). The interaction test with AtUXE3 showed no homodimerization (Figure 5, line 28), nor heterodimerization with AtRGP1 or AtRGP2 (Figure 5, lines 20, 24, 26 and 27). AtARAD1-NubG did not show positive signals with AtRGP1-Cub, AtRGP2-Cub or AtUXE3-Cub (Figure 5, lines 17, 21 and 25), suggesting no direct interaction with these proteins, however we cannot conclude if AtARAD1-NubG is functional.

DISCUSSION (1690 words)

Structural heterogeneity of RG-I in *Nicotiana tabacum* BY-2 suspension-cultured cells

Monosaccharide and linkage analyses combined with immunocytochemical labelling showed that RG-I in tobacco BY-2 suspension-cultured cells is composed of a backbone consisting of (4- α -D-GalUA β 1 \rightarrow 2- α -L-Rhap1) repeating unit where 50% of the rhamnosyl residues are substituted with arabinan, arabinogalactan and/or galactan side chains. Arabinan side chains are composed of (1 \rightarrow 5)- α -L-arabinan chain branched at 40% with arabinose residues and/or short (1 \rightarrow 5)- α -L-arabinan and/or short (1 \rightarrow 3)- α -L-arabinan at O-3, as we detected 5-Araf, 3-Araf, 3,5-Araf and T-Araf in the RG-I-enriched fraction. Branched arabinans are common RG-I side chains already described in plants including apple (Schols *et al.*, 1990), soybean (Huisman *et al.*, 2001; Nakamura *et al.*, 2002), sugar beet (Sakamoto and Sakai, 1995) and potato (Øbro *et al.*, 2004). AG side chains are often defined in the literature as (1 \rightarrow 4)- β -D-galactan, which may be branched at O-3 with α -L-Araf or arabinan, named type I AG; and (1 \rightarrow 3)- β -D-galactan branched at O-6 with galactan or arabinogalactan, terminated by α -L-Araf, named type II AG. Sometimes, (1 \rightarrow 3)- α -L-Araf-moieties, and other sugars such as Glc, Rha, and GlcUA can also be found in AG side chains. Here, we found 14% of (1 \rightarrow 4)- β -D-galactan side chain substituted at O-6, but we could not detect any substitution at O-3. Therefore, it seems that, in tobacco BY-2 suspension-cultured cells, RG-I does not contain type I AG in its side chains. However, an O-6 substitution in (1 \rightarrow 4)- β -D-galactan side chain by β -D-GlcUA and 4-O-methyl- β -D-GlcUA in RG-I of sycamore suspension cells has been described (An *et al.*, 1994). We detected a small amount of GlcUA (0.3%) in the monosaccharide composition, but the linkage analysis did not allow study of uronic acid sugars; therefore it is not possible to ascertain if this chain type exists in RG-I tobacco BY-2 suspension-cultured cells. Linkage analysis reveals also the presence of (1 \rightarrow 3)- β -D-galactan, with 17% of O-6 substitution, and the presence of (1 \rightarrow 6)- β -D-galactan showing type II AG side chains. This structure is typical of AGPs, and there is still no evidence that type II AG are side chains of RG-I or associated with a polymer, and co-extracted in the RG-I enriched fraction (Verhoef *et al.*, 2009). The LM16 antibody suggested the presence of another type of AG side chains in RG-I tobacco BY-2 suspension-cultured cells. This antibody has been obtained using RG-I isolated from apple fruit, which contains arabinogalactan side chains having (1 \rightarrow 3)- β -D-galactose residues (that can be branched with galactose residues), between branched (1 \rightarrow 5)- α -L-arabinan chain and RG-I backbone (Schols *et al.*, 1990). LM16 activity on sugar beet arabinan, whose AG side chain is composed of (1 \rightarrow 4)- β -D-galactose residues, between branched (1 \rightarrow 5)- α -L-arabinan chain and RG-I backbone (Sakamoto and Sakai, 1995), has been clearly shown by Verherbruggen *et al.* (2009). Interestingly, the sugar linkage analysis, showing the presence of 4-Galp, 3-Galp, 3,6-Galp and branched arabinan, coupled to LM16 immunolabelling, reveals that this type of AG side chain exists in the RG-I from BY-2 cells. Other arabinogalactan side chains with galactose residue between branched (1 \rightarrow 5)- α -L-arabinan chain and RG-I backbone have been described in soybean (Huisman *et al.*, 2001) and could be present in RG-I from tobacco BY-2 suspension-cultured cells.

The assembly pathway of RG-I within Golgi cisternae

Quantitative immunocytochemical studies of specific RG-I sugar epitopes were applied to enhance understanding of RG-I synthesis and assembly in the Golgi apparatus (Table 5). In 1992, Zhang and Staehelin, by using the antibody anti-PGA/RG-I, which is supposed to recognize the transition region between unesterified homogalacturonan and the first (1 \rightarrow 2)- α -rhamnosyl linked residue of RG-I (Moore *et al.*, 1991), detected PGA/RGI epitope in the *cis* and medial Golgi compartments of sycamore maple suspension-cultured cells. These data indicate that HG and RG-I backbone units are already assembled in this early Golgi compartment (see also Driouich *et al.*, 1993). In addition, it has been shown that HG and RG-I are covalently attached (Coenen *et al.*, 2007). As the INRA-RU1 sugar epitope, comprising at least six disaccharides repeats (4- α -D-GalUA β 1 \rightarrow 2- α -L-Rhap1) with no methylation and no acetylation (Ralet *et al.*, 2010; Macquet *et al.*, 2007), was localized to the medial cisternae, it could be postulated that RG-I backbone synthesis is initiated in the *cis* Golgi cisternae and extended in the medial cisternae. Then, (1 \rightarrow 5)- α -L-arabinan chains could be added in *trans* cisternae, as labelling with the LM13 antibody which binds preferentially 5 to 11 (1 \rightarrow 5)- α -L-arabinose residues forming unbranched and linearized arabinan chain (Moller *et al.*, 2008; Verherbruggen *et al.*, 2009) was mainly found over that late subcompartment. In the TGN, where LM5 epitopes consisting of at least 4 contiguous units of (1 \rightarrow 4)- β -D-galactosyl residues were detected (Jones *et al.*, 1997), (1 \rightarrow 4)- β -D-galactan chains could be initiated and/or elongated. We also detected a short (1 \rightarrow 5)- α -L-arabinan chain recognized by LM6 antibody in the TGN. In accordance with the literature (Willats *et al.*, 1998;

Lee *et al.*, 2005; Verhertbruggen *et al.*, 2009), our results support that the LM6 monoclonal antibody binds 2 to 6 arabinose residues from 1,5-linked arabinan sequences involved in branched backbone or short secondary side chains. Our immunogold data using LM16 indicate the presence of arabinogalactan chain composed of galactose/galactan stub with branched arabinan in the TGN.

To progress towards understanding the compartmentalization of RG-I assembly within Golgi cisternae, we performed a Golgi mapping of enzymes potentially involved in the arabinan chain synthesis: the putative arabinosyltransferase AtARAD1, the UDP-D-xylose-4-epimerase AtUXE1/MUR4, and its homolog AtUXE3. So far, few studies have been done on Golgi mapping of both sugar epitopes and enzymes (Zhang and Steahelin 1992; Chevalier *et al.*, 2010; Follet-Gueye *et al.*, 2012). Here, we show that AtARAD1-GFP and AtUXE3-GFP fused proteins are localized in the medial Golgi cisternae, and AtUXE1-GFP in the TGN.

Harholt *et al.* (2006) hypothesized that AtARAD1 is a processive arabinosyltransferase, probably involved in the arabinan backbone elongation. Different arabinosyltransferase activities are needed for the initiation, elongation and branching of the arabinan chains. Phylogenetic analysis of AtARAD1 homologs in Arabidopsis GT 47 family identified seven other proteins, among them AtARAD2, sharing 65% identity with AtARAD1. These two putative arabinan arabinosyltransferases are nonredundant (Harholt *et al.*, 2012), and form homo and heterodimers when they were co-overexpressed transitory in epidermal cells of *N.benthamiana* (Harholt *et al.*, 2012). *ARAD2* gene is less expressed in Arabidopsis tissues compared to *ARAD1*, and the cell wall arabinose content of *arad2* mutant is not affected. A significant detection of LM13 epitope was observed at the root surface of *arad2* mutant compared to wild-type, *arad1* and *arad1/arad2* double mutant, suggesting an involvement of AtARAD2 in the arabinan branching. As both AtARAD1 and AtARAD2 are associated in a complex (Harholt *et al.*, 2012) and AtARAD1 has been found in medial Golgi cisternae, we postulate that AtARAD2 also localized in this same compartment, and therefore that arabinan backbone is possibly elongated and branched in the medial compartment. We have localized unbranched and linearized arabinan chain epitopes with a length of 5 to 11 α -(1 \rightarrow 5)-L-arabinose residues in the *trans* cisternae with the LM13 antibody, and we have detected 1,5-linked arabinan sequences (2 to 6 arabinose residues) involved in branched backbone and short secondary side chains in the TGN with the LM6 antibody. It is therefore not surprising to detect the enzyme AtARAD1 in the medial cisternae and to detect linear arabinan chains (the "final" product) in a later compartment, since in the medial cisternae, arabinan chains assembly is in progress and the LM13 antibody needs at least 5 arabinose residues for recognition.

In which compartment is initiated the synthesis of arabinan, galactan or arabinogalactan side chains? As no specific antibody for initiation region is available, it remains difficult to draw a conclusion. But, as we have detected linear arabinan with LM13 and the putative arabinosyltransferase (AtARAD1-GFP) respectively in the *trans* and the medial cisternae, we propose that initiation of (1 \rightarrow 5)- α -L-arabinan starts at least in the medial compartment. It remains to be determined if the synthesis of the RG-I side chains could be initiated directly on the backbone, or if the side chains could be added on the backbone after their initiation.

Arabinan RG-I biosynthesis: Golgi protein complex research

Arabinan side chains of RG-I is known to influence the mechanical properties of the cell wall (Ulvskov *et al.*, 2005; Moore *et al.*, 2006; Harholt *et al.*, 2010). Arabinan synthesis involves the action of different partners within Golgi membranes. First, biosynthesis of UDP-Arap residues occurs *via* 4-epimerization of UDP-Xyl, then UDP-Arap is converted in UDP-Araf by arabinose mutase, and carried by UDP-Araf transporter and arabinosyltransferase. Using the split-ubiquitin system, we tested if the homolog of the xylose epimerase AtUXE1/MUR4, called AtUXE3, with the arabinose mutase AtRGP1 and AtRGP2, and the arabinosyltransferase AtARAD1 could be involved in a complex, as we localized AtUXE3 and AtARAD1 both in the same Golgi sub-compartment; namely the medial.

We confirm that AtRGP1 and AtRGP2 form homo and heterodimers (Rautengarten *et al.*, 2011). In contrast, we could not confirm that AtARAD1 forms homodimers (Harholt *et al.*, 2006), as AtARAD1-Cub was nonfunctional. We did not observe that AtUXE3 forms homo or heterodimers. Finally, we could not show any direct interactions between AtUXE3 and AtARAD1, AtRGP1 or AtRGP2 when using this system.

It could be helpful to explore the cell wall sugar content of *uxe3* mutant to determine whether AtUXE3 is really involved in RG-I arabinan synthesis, as well as more detailed studies of RG-I fractions in the *rgp* mutants to ensure that AtRGP-1 and -2 contribute to RG-I arabinan assembly. It should be noted that the lack of interaction in the split ubiquitin system does not indicate the lack of interaction *in vivo*. Furthermore, the proteins could be found within the same complexes without direct interaction. Recently, DePino *et al.* (2013) have examined RGP oligomerisation in *Solanum tuberosum*, and proposed that class 2 RGPs (*e.g.* AtRGP4 or AtRGP5), with no mutase activity, could be directly involved in Golgi membrane binding of RGP oligomers. According to this model, it is possible that AtRGP1 and AtRGP2 interact indirectly with Golgi membranes *via* AtRGP4/5, although this possibility remains to be tested. Further studies are required to verify potential interaction between AtUXE3 and AtARAD1, and perhaps AtARAD2. So far, none of the UDP-Araf transporters has been characterized. Such transporters represent a good candidate partner linking mutases and arabinosyltransferases, from the cytosol to the Golgi lumen (Søgaard *et al.*, 2012).

EXPERIMENTAL PROCEDURES (1101 words)

Plant material and growth conditions

Suspension cells of *Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow 2 (BY-2) were cultured in the Murashige and Skoog liquid medium (Sigma M5524, <http://www.sigmaaldrich.com>): 4.3 g/L in sucrose 30 g/L, KH₂PO₄ 100 mg/L, myo-inositol 51 mg/L, thiamine 1 mg/L, 2.4 dichlorophenoxyacetic acid 0.22 mg/L, pH 5.6, in dark, at 22°C, 140 rpm. Cells were subcultured every week by transferring 10 mL of suspension cells in 150 mL of fresh medium.

Isolation of RG-I from tobacco BY-2 suspension-cultured cells

One hundred mL of 4 d-old tobacco BY-2 suspension-cultured cells were filtered, ground and heated twice in 70% ethanol at 70°C for 15 min. The homogenate was treated with a solution of chloroform/methanol (1/1, v/v) for 15 min following by acetone for 15 min before drying. The resulting alcohol insoluble residue was incubated in imidazole-HCl 500 mM pH 7 overnight. The pectin-enriched fraction was then extracted from the insoluble residue by boiling in 0.5% oxalate ammonium for 1 h. After centrifugation at 2,000 g, the supernatant was dialyzed against water and then freeze-dried.

Quantification of monosaccharides

Sugar composition of the pectin-enriched fraction was determined by gas liquid chromatography (GLC) analysis of the trimethylsilyl methylglycoside derivatives using inositol as internal standard. Briefly, samples were heated overnight in 1 M methanolic-HCl (Sigma) at 80°C for methanolysis. After evaporation of the reagent, the methylglycosides were converted into their trimethylsilyl derivatives by heating the samples for 20 min at 110°C in hexamethyldisilazane / trimethylchlorosilane / pyridine (3/1/9; Sigma). After evaporation, the samples were suspended in cyclohexane before being injected on a DB-1 column (DB-1 Supelco). Chromatographic data were integrated with GLC Star Workstation software (Varian), each surface being corrected according to its response factor.

Sugar linkage analysis

The permethylation analysis of the pectin-enriched fraction was carried out as reported in Ciucanu and Kerek (1984). The permethylated sample was then hydrolyzed, reduced and acetylated as described in Dardelle *et al.* (2010). No prior reduction of uronic acids was used in the protocol and as a consequence, linkage analysis of only neutral monosaccharides was performed. The partially methylated alditol acetates were separated by GLC (Hewlett-Packard 6890) on an Optima 5-MS capillary column (30 m i.d., 0.25 mm; Macherey Nagel) and analyzed by electron impact mass spectrometry (EIMS) using an Autospec mass spectrometer (Micromass) equipped with an Opus 3.1 data system.

Cloning procedure

The coding sequence of AtARAD1 (At2g35100), AtUXE1/MUR4/HSR8 (At1g30620) and AtUXE3/MEE25 (At2g34850), were amplified by PCR without the stop codon using respectively Forward Kpn1 (5'-GGGGTACCCCATGGCGCGTAAATCTTCC -3') and Reverse Spe1 (5'-GGACTAGTAATGGAAGTGATAAGACC-3') primers for AtARAD1; Forward BamH1 (5'-CGCGGATCCCGATGTTTAGTTTTGGCCGAGCA-3') and Reverse Spe1 (5'-GGACTAGTGAAACCGAGACCGATGAGGT-3') primers for MUR4; and Forward (5'-CACCATGGCTGCTCATGGTGTGAAG-3') and Reverse (5'-CATGTATGCAGAAACCAAGGA-3')

primers for AtUXE3. The SALK cDNA clones were used as template (respectively U67266, U21248 and U21365).

For AtARAD1 and AtUXE1, the amplified cDNA were introduced in vectors and fused to the sGFP as described in Chevalier *et al.* (2010). The amplified cDNA of AtUXE3 was introduced in pENTR-D-TOPO, and fused to the GFP by introducing in pMDC83 vector (Curtis and Grossniklaus, 2003) using Gateway technology by LR clonase reaction.

Stable expression in *Nicotiana tabacum*

The generated plasmids were transferred into *Agrobacterium tumefaciens* (strain GV3101 pMP90 for AtARAD1 and AtUXE1, and EHA105 for AtUXE3 as described in Chevalier *et al.* (2010).

Immunolocalization of Rhamnogalacturonan-I epitopes inside tobacco BY-2 protoplasts

Protoplasts preparation, immunostaining and confocal microscopy were done exactly as described in Chevalier *et al.*, 2010. INRA-RU1 and INRA-RU2 antibodies (Dr Fabienne Guillon, INRA, UR1268 Biopolymères Interactions Assemblages, guillon@nantes.inra.fr) were diluted at 1/3 in incubation buffer and LM5, LM6, LM13 and LM16 (Plantprobes; <http://www.plantprobes.net/>) antibodies were not diluted.

Immunolocalization Rhamnogalacturonan-I epitopes in tobacco BY-2 cells wall

Immunostaining and observation were done as describe in Chevalier *et al.* (2010), but on entire BY-2 suspension-cultured cells using INRA-RU2 as primary antibody.

Localization of fusion proteins in *N. tabacum*

Subcellular localization of fusion proteins were examined using a Leica TCS SP2 AOBS confocal laser scanning microscope. GFP fluorescence of suspension cultured cells was imaged using an excitation wavelength of 488 nm with the emission wavelength at 500 nm to 520 nm.

High pressure freezing (HPF) and freeze substitution (FS)

BY-2 suspension-cultured cells were fixed by high pressure freezing and freeze substituted exactly as described in Chevalier *et al.*, 2010.

Immunogold labelling of Rhamnogalacturonan - I epitopes

Ultrathin sections (90 nm; ultracut UCT Leica Vienna Austria) of tobacco cells were collected on to carbon-formvar-coated nickel grids and blocked in TBS (Tris-Buffered Saline: Tris-HCl 20mM pH 7.2, 200 mM NaCl) supplemented with 0.2% of BSA and milk 3% for 30 min. Sections were then incubated with the neat solution of monoclonal antibody (INRA-RU1, INRA-RU2, LM5, LM6, LM13, LM16) for 3h at room temperature. After washing in TBS + BSA 0.2% buffer, grids were incubated for 1h at room temperature in the mouse secondary antibody (INRA-RU1, INRA-RU2) or rat secondary antibody (LM5, LM6, LM13, LM16) conjugated to 10 nm gold particles (dilution 1/20, Tebu-British Biocell International). After washing and fixation in TBS+ 2% glutaraldehyde, sections were first stained with 2% vapour osmium for 3 hours followed by classical staining using uranyl acetate and lead citrate. Sections were observed in a Philips, FEI Tecnai 12 Biotwin transmission electron microscope operating at 80 kV, with ES500W Erlangshen CCD camera (Gatan).

Immunogold labelling of GFP-tagged proteins

Immunolabelling was done exactly as described in Chevalier *et al.* (2010).

Quantifying immunogold labelling and statistical analysis

The procedure was done exactly as described in Chevalier *et al.* (2010).

Split ubiquitin assay

The split-ubiquitin assay was performed using the yeast strain NMY51 and the bait vectors pBT3-N or pDHB1 and the prey vector pPR3-N (Dualsystems Biotech AG).

Coding sequences of AtARAD1, AtRGP1, AtRGP2 and AtUXE3 were PCR amplified and subsequently ligated into the vectors using the SfiI restriction site (see Table S7, Dualsystems Biotech AG). AtARAD1 was cloned into the bait vector pBT3-N and the prey vector pPR3-N (Dualsystems Biotech AG). AtRGP1, AtRGP2 and AtUXE3 were cloned into the bait vector pDHB1, linking the soluble proteins to the ER membrane via Ost4 anchor domain, and the prey vector pPR3-N (Dualsystems Biotech AG). The plasmids were pairwise inserted into the yeast NMY51 using the LiAc transformation method (Gietz and Woods 2002), plated on SD-Leu-Trp plates and grown at 30°C for 3

days. Yeast carrying both vectors were picked and grown O/N in liquid SD-Leu-Trp media and subsequently spotted in a SD-His-Leu-Trp-Ade plate in equal concentrations and grown for at 30°C for 3 days.

XGal assay, which tests β -Galactosidase activity, was performed in growing yeast on SD-His-Leu plates as in (Obrdlik, El-Bakkoury et al. 2004). Growth on the SD-His-Leu-Trp-Ade media and blue color formation, β -galactosidase activity, combined is an indication of interaction.

ACKNOWLEDGEMENTS (96 words)

We would like to thank C.Rautengarten, Ph.D. (Joint BioEnergy Institute/Feedstocks Division, Lawrence Berkeley National Laboratory) for providing us the cDNA of ArRGP1 and 2; Pr A. Faik (Department of Plant Biology, Ohio University) for providing pENTR-D-TOPO and pMDC83 vectors for cloning and Dr F. Guillon (UR1268, INRA, Nantes, France) for providing INRA-RU1/2 antibodies. We would like to thank the Grand Réseau de Recherche named "Végétal, Agronomie, Sol, Innovation" (GRR VASI) and the Structure Fédérative de Recherche named Institut de Recherche et d'Innovation Biomédicale (SFR IRIB) for providing funding on "Protein trafficking in animal and plant systems".

SUPPORTING INFORMATIONS

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Figure S1: Immunogold localization of Rhamnogalacturonan-I epitopes present in Golgi stacks of wild-type tobacco BY-2 suspension-cultured cells.

Figure S2: Subcellular localization of Rhamnogalacturonan-I epitopes recognized by INRA-RU2 on entire tobacco BY-2 suspension-cultured protoplasts

Table S1: Quantitative analysis of INRA-RU1 labelling over Golgi stacks in wild-type tobacco BY-2 suspension-cultured cells

Table S2: Quantitative analysis of LM5 labelling over Golgi stacks in wild-type tobacco BY-2 suspension-cultured cells

Table S3: Quantitative analysis of LM16 labelling over Golgi stacks in wild-type tobacco BY-2 suspension-cultured cells

Table S4: Quantitative analysis of LM13 labelling over Golgi stacks in wild-type tobacco BY-2 suspension-cultured cells

Table S5: Quantitative analysis of anti-GFP labelling over Golgi stacks in tobacco BY-2 suspension-cultured cells expressing AtUXE3-GFP

Table S6: Quantitative analysis of anti-GFP labelling over Golgi stacks in tobacco BY-2 cells expressing AtUXE1/MUR4-GFP

Table S7: Primer sequences used to for cloning of AtARAD1, AtRGP1, AtRGP2 and AtUXE3 genes into the bait vector (pBT3-N or pDHB1) and prey vector (pPR3-N).

TABLE LEGENDS (title = 64 words)

Table 1: Monosaccharide composition and linkage analysis of the pectin-enriched fraction. (a) The monosaccharide composition was determined by GLC analysis of trimethylsilyl methylglycosides and expressed as mol %. Values are means \pm SEM from three independent experiments. (b) The sugar linkage analysis was determined by GLC-EIMS of partially methylated alditol acetate and expressed as mol %. nd: not detected. Ara: Arabinose; Fuc: Fucose; Gal: Galactose; GalUA: Galacturonic acid; Glc: Glucose; GlcUA: Glucuronic acid; Rha: Rhamnose; Xyl: Xylose.

Table 2: Antibodies used in this study. Mouse monoclonal antibodies, INRA-RU1 and INRA-RU2 are specific for the backbone of RG-I. Rat monoclonal LM13 and LM6 antibodies bind arabinan side chains, whereas LM5 and LM16 recognize galactan and arabinogalactan branching respectively.

Table 3: Quantitative analysis of LM6 labelling over Golgi stacks in wild-type tobacco BY-2 suspension-cultured cells. (a) Comparison of gold particle distribution within Golgi subcompartments of wild-type cells immunolabelled with or without the primary antibody LM6. Quantification of labelling was done on 55 Golgi stacks for each line. The total χ^2 value (24.70+6.21=30.91) compared to that of contingency table analysis, with a degree of freedom of 3, confirms that gold particles distribution is due to LM6 with $\alpha < 0.005$. (b) Observed and expected distribution of gold particles in subtypes of Golgi cisternae of wild-type tobacco BY-2 suspension-cultured cells and relative labelling index values. Asterisks (*) identify Golgi compartments that are preferentially labelled.

Table 4: Quantitative analysis of anti-GFP labelling over Golgi stacks in tobacco BY-2 suspension-cultured cells expressing AtARAD1-GFP. (a) Comparison of gold particle distribution within Golgi subcompartments of wild-type and transformed cells (expressing AtARAD1-GFP) of BY-2 suspension-cultured cells. Quantification of labelling was done on 50 Golgi stacks for each line. The total χ^2 value (56.86 + 30.12 = 86.98) compared to that of contingency table analysis, with a degree of freedom of 3, confirms specificity of gold particle distribution between wild-type and transformed cells with $\alpha < 0.005$. (b) Observed and expected distribution of gold particles in subtypes of Golgi cisternae of tobacco BY-2 suspension-cultured cells expressing AtARAD1-GFP and relative labelling index values. Asterisks (*) identify Golgi compartments that are preferentially labelled.

Table 5: A proposed pathway RG-I synthesis and assembly in the Golgi apparatus. PGA/RG-I epitopes were detected in sycamore maple suspension-cultured cells (Zhang and Staehelin, 1992; Driouch et al., 1993). Here, quantitative immunogold analysis (see also table 3) of INRA-RU1, LM5, LM6, LM13 and LM16 was performed in tobacco BY-2 suspension-cultured cells (deep squares). First, data suggest that RG-I backbone synthesis is initiated in the *cis* Golgi subcompartment, extends in the *medial* subcompartment, and that arabinan and galactan or arabinogalactan side chains elongation occurs at least in the *trans* Golgi subcompartment and the TGN respectively. And, secondly, data confirm that the methylesterification of galacturonic acid residues takes place in the late Golgi compartment.

FIGURES LEGENDS (336 words)

Figure 1: Confocal microscope images showing subcellular localization of rhamnogalacturonan-I epitopes within tobacco BY-2 protoplasts. Fluorescent spots (~1 μ m in diameter), that are typical of Golgi localization, are observed following labelling with INRA-RU1 (A), INRA-RU2 (B), LM5 (C), LM6 (D), LM13 (E) and LM16 (F). Scale bar = 5 μ m.

Figure 2: Immunogold localization of rhamnogalacturonan-I epitopes in HPF/FS tobacco BY-2 suspension-cultured cells. Electron micrographs illustrate labelling of Golgi units and secretory vesicles with the monoclonal antibody LM6 (A), and of Golgi stacks and the cell wall with the monoclonal antibody LM 16 (B, C). White arrows indicate gold particles in B. CW : cell wall, ER : endoplasmic reticulum, G : Golgi stacks, M : mitochondria, N, nucleus; NM : nuclear membrane, NP : nuclear pore, PM : plasma membrane; TGN : trans-Golgi network; V, vacuole. Scale bars = 100 nm.

Figure 3: Distribution of AtARAD1-GFP, AtUXE1/MUR4-GFP, and AtUXE3-GFP in living tobacco BY-2 suspension-cultured cells. Stable expression of AtARAD1-GFP (A), AtUXE1/MUR4-GFP (B), and AtUXE3-GFP (C) in tobacco BY-2 suspension-cultured cells also shows fluorescent spots typical of Golgi localization. Scale bars : 8 μ m.

Figure 4: Immunogold localization of AtARAD1-GFP, AtUXE1/MUR4-GFP, and AtUXE3-GFP fusion protein in Golgi stacks of transformed tobacco BY-2 suspension-cultured cells with anti-GFP antibodies. ER, endoplasmic reticulum; TGN, *trans*-Golgi network. Arrows indicate gold particles. Scale bars: 100 nm.

Figure 5: Droptest and X-gal assay used to detect protein-protein interaction using the split-ubiquitin system between AtARAD1, AtRGP1, AtRGP2 and AtUXE3. Transformed yeast containing the indicated combinations of bait and prey proteins were spotted in equal concentrations on SD-His-Leu-Trp-Ade plates in a dilution series from 1x, 10x, 100x, to 1000x and incubated at 30°C for 3 days. Growth on SD-His-Leu-Trp-Ade plates indicates that two proteins of a given combination are interacting. X-Gal assay test for β -galactosidase activity, which is a reporter for interaction upon blue

color formation. The baits when co-expressed with pOst1-Nubl tests for functionality and when co-expressed with PR3-N tests for random interaction. The preys when co-expressed with the type II membrane protein AtXXT2 tests for random interaction.

REFERENCES

- Albersheim P, Darvill AG, O'Neill MA, Schols HA, Voragen AGJ (1996) An hypothesis: the same six polysaccharides are components of the primary cell walls of all higher plants. In *Pectins and Pectinases*. Edited by Visser J, Voragen AGJ. Amsterdam: Elsevier Sciences B.V.; p 47-53.
- An J, O'Neill MA, Albersheim P, Darvill AG (1994) Isolation and structural characterization of beta-D-glucosyluronic acid and 4-O-methyl beta-D-glucosyluronic acid-containing oligosaccharides from the cell-wall pectic polysaccharide, rhamnogalacturonan I. *Carbohydr Res.* **252**:235-43.
- Atmodjo MA, Hao Z, Mohnen D (2013) Evolving views of pectin biosynthesis. *Annu Rev Plant Biol.* **64**:747-79.
- Atmodjo MA, Sakuragi Y, Zhu X, Burrell AJ, Mohanty SS, Atwood JA 3rd, Orlando R, Scheller HV, Mohnen D. (2011) Galacturonosyltransferase (GAUT)1 and GAUT7 are the core of a plant cell wall pectin biosynthetic homogalacturonan: galacturonosyltransferase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **108**(50):20225-30.
- Baldwin TC, Handford MG, Yuseff MI, Orellana A, Dupree P. (2001) Identification and characterization of GONST1, a golgi-localized GDP-mannose transporter in Arabidopsis. *Plant Cell* **13**(10):2283-95.
- Brickell LS, Reid JSG (1996) Biosynthesis in vitro of pectic (1-4)-beta-D-galactan. In: Visser J (ed) *Pectins and pectinases*. Elsevier, Amsterdam, pp 127-134
- Burget EG, Verma R, Mølhøj M, Reiter WD. (2003) The biosynthesis of L-arabinose in plants: molecular cloning and characterization of a Golgi-localized UDP-D-xylose 4-epimerase encoded by the MUR4 gene of Arabidopsis. *Plant Cell.* **15**(2):523-31.
- Burget EG, Reiter WD. (1999) The mur4 mutant of Arabidopsis is partially defective in the de novo synthesis of uridine diphospho L-arabinose. *Plant Physiol.* **121**(2):383-9.
- Caffall K.H., Mohnen D. (2009) The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides *Carbohydrate Research* **344**: 1879-1900.
- Chevalier L, Bernard S, Ramdani Y, Lamour R, Bardor M, Lerouge P, Follet-Gueye ML, Driouich A. (2010) Subcompartment localization of the side chain xyloglucan-synthesizing enzymes within Golgi stacks of tobacco suspension-cultured cells. *Plant J* **64**: 977-989.
- Chou YH, Pogorelko G, Zobotina OA (2012) Xyloglucan xylosyltransferases XXT1, XXT2, and XXT5 and the glucan synthase CSLC4 form Golgi-localized multiprotein complexes. *Plant Physiol.* **159**(4):1355-66.
- Ciucanu I. and Kerek F. (1984) A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydr. Res.* **131**: 209-217.
- Coenen GJ, Bakx EJ, Verhoef RP, Schols HA, Voragen AGJ (2007) Identification of the connecting linkage between homo- or xylogalacturonan and rhamnogalacturonan type I. *Carbohydrate Polymers* **70** :224-235.
- Cocuron JC, Lerouxel O, Drakakaki G, Alonso AP, Liepman AH, Keegstra K, Raikhel N, Wilkerson CG. (2007) A gene from the cellulose synthase-like C family encodes a beta-1,4 glucan synthase. *Proc Natl Acad Sci USA.* **104**: 8550-8555.
- Curtis MD, Grossniklaus U. (2003) A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiol.* **133**(2):462-9.
- Dardelle F., Lehner A., Ramdani Y., Bardor M., Lerouge P., Driouich A. and Mollet J-C. (2010) Biochemical and immunocytological characterizations of Arabidopsis pollen tube cell wall. *Plant physiol.* **153**: 1563-1576.
- Davis JK (2012) Combining polysaccharide biosynthesis and transport in a single enzyme: dual-function cell wall glycan synthases. *Frontiers in plant science* **3**:138.
- Delgado IJ, Wang Z, de Rocher A, Keegstra K and Raikhel NV (1998) Cloning and Characterization of AtRGP11 - A Reversibly Autoglycosylated Arabidopsis Protein Implicated in Cell Wall Biosynthesis *Plant Physiol.* **116**: 1339-1349.
- De Pino V, Marino Busjle C, Moreno S. (2013) Oligomerization of the reversibly glycosylated polypeptide: its role during rice plant development and in the regulation of self-glycosylation. *Protoplasma.* **250**(1):111-9.
- De Pino V, Borán M, Norambuena L, González M, Reyes F, Orellana A, Moreno S. (2007) Complex formation regulates the glycosylation of the reversibly glycosylated polypeptide. *Planta.* **226**(2):335-45.

- Dhugga KS, Tiwari SC, Ray PM. (1997) A reversibly glycosylated polypeptide (RGP1) possibly involved in plant cell wall synthesis: purification, gene cloning, and trans-Golgi localization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**(14):7679-84.
- Dhugga KS, Ulvskov P, Gallagher SR, Ray PM. (1991) Plant polypeptides reversibly glycosylated by UDP-glucose. Possible components of Golgi beta-glucan synthase in pea cells. *J Biol Chem.* **266**(32):21977-84.
- Driouich A, Follet-Gueye ML, Bernard S, Kousar S, Chevalier L, Vicré-Gibouin M, Lerouxel O. (2012) Golgi-mediated synthesis and secretion of matrix polysaccharides of the primary cell wall of higher plants. *Frontiers in Plant Science* **3**:79.
- Driouich A, Zhang GF, Staehelin LA. (1993) Effect of Brefeldin A on the structure of the golgi apparatus and on the synthesis and secretion of proteins and polysaccharides in sycamore maple suspension-cultured cells. *Plant Physiol.* **101**: 1363-1373.
- Eda S., Akiyama Y., Kato K. (1985) A galactoglucomannan from cell walls of suspension cultured tobacco (nicotiana tabacum) cells *Carbohydrate Research*, **137**: 173-181.
- Eda S, Akiyama Y, Kato K (1983) Methylation Analysis of Cell Wall Polysaccharides from Suspension-cultured Cells of Nicotiana tabacum *Agric. Biol Chem.*, **47**(8): 1783-1789.
- Follet-Gueye ML., Mollet JC., Vicré-Gibouin M., Bernard S., Chevalier L., Plancot B., Dardelle F., Ramdani Y, Coimbra S. and Driouich A. (2012) Immuno-Glyco-Imaging in Plant Cells: Localization of Cell Wall Carbohydrate Epitopes and Their Biosynthesizing Enzymes. In Applications of Immunocytochemistry. Ed. Hesam Dehghani ISBN 978-953-51-0229-8. pp 297-320.
- Freshour G, Clay RP, Fuller MS, Albersheim P, Darvill AG, Hahn MG (1996) Developmental and Tissue-Specific Structural Alterations of the Cell-Wall Polysaccharides of Arabidopsis thaliana Roots. *Plant Physiol.* **110**(4):1413-1429.
- Geshi N, Pauly M and Ulvskov P (2002) Solubilization of galactosyltransferase that synthesizes 1,4-b-galactan side chains in pectic rhamnogalacturonan. *Physiologia Plantarum* **114**: 540–548.
- Gietz, R. D. and R. A. Woods (2002). "Transformation of yeast by the liac/ss carrier dna/peg method." *Methods in Enzymology* **350**: 87-96.
- Goubet F and Morvan C (1993) Evidence for Several Galactan Synthases in Flax (Linum usitatissimum L.) Suspension-Cultured Cells. *Plant Cell Physiol.* **34**(8): 1297-1303.
- Guillemin F, Guillon F, Bonnin E, Devaux MF, Chevalier T, Knox JP, Liners F, Thibault JF (2005) Distribution of pectic epitopes in cell walls of the sugar beet root. *Planta* **222**(2):355-71.
- Handford M, Rodríguez-Furlán C, Marchant L, Segura M, Gómez D, Alvarez-Buylla E, Xiong GY, Pauly M, Orellana A. (2012) Arabidopsis thaliana AtUTr7 encodes a golgi-localized UDP-glucose/UDP-galactose transporter that affects lateral root emergence. *Mol Plant.* **5**(6):1263-80.
- Harholt J, Jensen JK, Verhertbruggen Y, Søgaard C, Bernard S, Nafisi M, Poulsen CP, Geshi N, Sakuragi Y, Driouich A, Knox JP, Scheller HV.(2012) ARAD proteins associated with pectic Arabinan biosynthesis form complexes when transiently overexpressed in planta. *Planta.* **236**(1):115-28.
- Harholt, J., Suttangkakul, A., and Vibe Scheller, H. (2010) Biosynthesis of pectin. *Plant Physiol.* **153**: 384–395.
- Harholt J, Jensen JK, Sorensen SO, Orfila C, Pauly M, et al. (2006) ARABINAN DEFICIENT 1 is a putative arabinosyltransferase involved in biosynthesis of pectic arabinan in Arabidopsis. *Plant Physiol* **140**: 49–58.
- Huisman MMH, Brüll LP, Thomas-Oates JE, Haverkamp J, Schols HA, Voragen AGJ (2001) The occurrence of internal (1-5)-linked arabinofuranose and arabinopyranose residues in arabinogalactan side chains from soybean pectic substances. *Carbohydrate Research* **330**: 103–114.
- Jones L., Seymour C. B., and Knox J.P (1997) Localization of Pectic Galactan in Tomato Cell Walls Using a Monoclonal Antibody Specific to (1 →4)-β-D-Galactan *Plant Physiol.* **113**: 1405-1412.
- Kato H, Takeuchi Y, Tsumuraya Y, Hashimoto Y, Nakano H, Kovác P. (2003) In vitro biosynthesis of galactans by membrane-bound galactosyltransferase from radish (Raphanus sativus L.) seedlings. *Planta* **217**(2):271-82.
- Keegstra K, Raikhel N. (2001) Plant glycosyltransferases. *Curr Opin Plant Biol.* **4**(3):219-24.
- Knox JP (2008) Revealing the structural and functional diversity of plant cell walls. *Curr Opin Plant Biol.* **11**(3):308-13.
- Konishi T, Kotake T, Tsumuraya Y (2007) Chain elongation of pectic β(1,4)-galactan by a partially purified galactosyltransferase from soybean (*Glycine max* Merr.) hypocotyls *Planta* **226**:571–579.

- Konishi T, Mitome T, Hatsushika H, Md. Haque A, Kotake T, Tsumuraya Y (2004) Biosynthesis of pectic galactan by membrane-bound galactosyltransferase from soybean (*Glycine max* Merr.) seedlings *Planta* **218**: 833–842.
- Lee KJ, Cornuault V, Manfield IW, Ralet MC, Paul Knox J. (2013) Multi-scale spatial heterogeneity of pectic rhamnogalacturonan I (RG-I) structural features in tobacco seed endosperm cell walls. *Plant J.* **75**(6):1018-27.
- Lee, K.J.D., Sakata, Y., Mau, S.-L., Pettolino, F., Bacic, A., Quatrano, R.S., Knight, C.D. and Knox, J.P. (2005) Arabinogalactan-proteins are required for apical cell extension in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Cell* **17**: 3051–3065.
- Liwanag AJ, Ebert B, Verherbruggen Y, Rennie EA, Rautengarten C, Oikawa A, Andersen MC, Clausen MH, Scheller HV. (2012) Pectin biosynthesis: GAL51 in *Arabidopsis thaliana* is a β -1,4-galactan β -1,4-galactosyltransferase. *Plant Cell* **24**(12):5024-36.
- Macquet A, Ralet M-C, Kronenberger J, Marion-Poll A, North HM (2007) In situ, chemical and macromolecular study of the composition of *Arabidopsis thaliana* seed coat mucilage. *Plant Cell Physiol* **48**:984–999.
- Marcus Susan E , Verherbruggen Yves , Hervé Cécile , Ordaz-Ortiz José J , Farkas Vladimir , Pedersen Henriette L Willats William GT and Knox Paul J (2008) Pectic homogalacturonan masks abundant sets of xyloglucane epitopes in plant cell walls *BMC Plant Biology* **8**:60-72.
- Mayhew T. M. (2011) Quantifying immunogold localization on electron microscopic thin sections: a compendium of new approaches for plant cell biologists *J. Exp. Bot.* **62**(12): 4101-4113.
- Mayhew T.M., Lucocq J.M. (2008) Developments in cell biology for quantitative immunoelectron microscopy based on thin sections: a review *Histochem Cell Biol* **130**:299–313.
- Mohnen, D. (2008). Pectin structure and biosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* **11**: 266–277.
- Moller, I., Marcus, S.E., Haeger, A., Verherbruggen, Y., Verhoef, R., Schols, H., Ulvskov, P., Mikkelsen, J.D., Knox, J.P. and Willats, W. (2008) High-throughput screening of monoclonal antibodies against plant cell wall glycans by hierarchical clustering of their carbohydrate microarray binding profiles. *Glycoconj. J.* **25**: 37–48.
- Moore JP, Nguema-Ona E, Chevalier L, Lindsey GG, Brandt WF, Lerouge P, Farrant JM, Driouich A. (2006) Response of the leaf cell wall to desiccation in the resurrection plant *Myrothamnus flabellifolius*. *Plant Physiol.* **141**(2):651-62.
- Moore, P. J., K. M. M. Swords, M. A. Lynch, and L. A. Staehelin. (1991) Spatial organization of the assembly pathways of glycoproteins and complex polysaccharides in the Golgi apparatus of plants. *J. Cell Biol.* **112**(4):589-602.
- Mori M. and Kato K. (1981) An arabinoglucuronomannan from suspension-cultured cells of *Nicotiana tabacum*. *Carbohydrate Research.* **91**: 49-58.
- Nakamura, A., Furuta, H., Maeda, H., Takao, T., Nagamatsu, Y., (2002). Analysis of the molecular construction of xylogalacturonan isolated from soluble soybean polysaccharides. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**: 1155–1158.
- Nebenführ, A., Gallagher, L., Dunahay, T.G., Frohlick, J.A., Mazurkiewicz, A.M., Meehl, J.B. and Staehelin, L.A. (1999) Stop-and-go movements of plant Golgi stacks are mediated by the actomyosin system. *Plant Physiol.* **121**: 1127–1141.
- Nguema-Ona E, Andeme-Onzighi C, Aboughe-Angone S, Bardor M, Ishii T, Lerouge P, Driouich A. (2006) The *reb1-1* mutation of *Arabidopsis*: Effect on the structure and the localization of galactose containing cell wall polysaccharides. *Plant Physiol.* **140**: 1406-1417.
- Norambuena L, Nilo R, Handford M, Reyes F, Marchant L, Meisel L, Orellana A (2005) AtUTr2 is an *Arabidopsis thaliana* nucleotide sugar transporter located in the Golgi apparatus capable of transporting UDP galactose. *Planta*, **222**:521-529.
- Øbro J, Harholt J, Scheller HV, Orfila C (2004) Rhamnogalacturonan I in *Solanum tuberosum* tubers contains complex arabinogalactan structures. *Phytochemistry* **65**:1429–1438.
- Obrdlik, P., M. El-Bakkoury, et al. (2004). "K⁺ channel interactions detected by a genetic system optimized for systematic studies of membrane protein interactions." *PNAS - USA* **101**(33): 12242-12247.
- Pagny, S., Bouissoniee´, F., Sarkar, M., Follet-Gueye, M.L., Driouich, A., Schachter, H., Faye, L. and Gomord, V. (2003) Structural requirements for *Arabidopsis* b1-2 xylosyltransferase activity and targeting to the Golgi. *Plant J.* **33** : 189–203.
- Popper ZA., Fry SC. (2005) Widespread occurrence of a covalent linkage between xyloglucan and acidic polysaccharides in suspension-cultured angiosperm cells. *Annals of Botany.* **96**: 91–99.
- Ralet MC, André-Leroux G, Quéméner B, Thibault JF. (2005). Sugar beet (*Beta vulgaris*) pectins are covalently cross-linked through diferulic bridges in the cell wall. *Phytochemistry* **66**:2800–14.

- Ralet MC, Tranquet O, Poulain D, Moïse A, Guillon F.(2010) Monoclonal antibodies to rhamnogalacturonan I backbone. *Planta*. **231**(6):1373-83 .
- Rautengarten, C., B. Ebert, et al. (2011). "The Interconversion of UDP-Arabinopyranose and UDP-Arabinofuranose Is Indispensable for Plant Development in Arabidopsis." *The Plant Cell Online* **23**(4): 1373-1390.
- Reiter WD (2008) Biochemical genetics of nucleotide sugar interconversion reactions. *Curr Opin Plant Biol.* **11**(3):236-43.
- Reyes F, Orellana A. (2008) Golgi transporters: opening the gate to cell wall polysaccharide biosynthesis. *Curr Opin Plant Biol.* **11**(3):244-51.
- Ridley, B.L., O'Neill, M.A., Mohnen, D. (2001). Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* **57**(6): 929-967.
- Rösti J, Barton CJ, Albrecht S, Dupree P, Pauly M, Findlay K, Roberts K, Seifert GJ. (2007) UDP-glucose 4-epimerase isoforms UGE2 and UGE4 cooperate in providing UDP-galactose for cell wall biosynthesis and growth of Arabidopsis thaliana. *Plant Cell.* **19**(5):1565-79.
- Sakamoto T, Sakai T (1995) Analysis of structure of sugar-beet pectin by enzymatic methods. *Phytochemistry* **39**(4):821-3.
- Scheller, H.V, Jensen J.K, Sørensen S.O, Harholt J, Geshi N (2007) Biosynthesis of pectins. *Physiol. Plant.* **129**: 283–295.
- Schols HA, Posthumus MA and Voragent AGJ (1990) Structural features of hairy regions of pectins isolated from apple juice produced by the liquefaction process. *Carbohydrate Research*, **206**: 17-129.
- Seifert GJ, Barber C, Wells B, Roberts K. (2004) Growth regulators and the control of nucleotide sugar flux. *Plant Cell.* **16**:723-730.
- Seifert GJ, Barber C, Wells B, Dolan L, Roberts K (2002) Galactose biosynthesis in Arabidopsis: genetic evidence for substrate channeling from UDP-D-galactose into cell wall polymers. *Curr Biol.* **12**(21):1840-5.
- Sims IM, Craik DJ, Bacic A (1997) Structural characterisation of galactoglucomannan secreted by suspension-cultured cells of *Nicotiana glauca*. *Carbohydrate Research* **303**:79-92.
- Søgaard C, Stenbaek A, Bernard S, Hadi M, Driouich A, Scheller HV, Sakuragi Y (2012) GO-PROMTO Illuminates Protein Membrane Topologies of Glycan Biosynthetic Enzymes in the Golgi Apparatus of Living Tissues. *PLoS One*, **7**(2): e31324.
- Ulvskov P, Wium H, Bruce D, Jørgensen B, Qvist KB, Skjøt M, Hepworth D, Borkhardt B, Sørensen SO. (2005) Biophysical consequences of remodeling the neutral side chains of rhamnogalacturonan I in tubers of transgenic potatoes. *Planta*. **220**(4):609-20.
- Verherbruggen Y., Marcus S. E., Haeger A., Verhoef R., Schols H.A., McCleary B.V., McKee L., Gilbert H. J. and Knox J. P. (2009) Developmental complexity of arabinan polysaccharides and their processing in plant cell walls *Plant J.* **59**(3):413-25.
- Verhoef, R., Lu, Y., Knox, J.P., Voragen, A.G.J. and Schols, H.A. (2009) Fingerprinting complex pectins by chromatographic separation combined with ELISA detection. *Carbohydr. Res.* **344** : 1808-1817.
- Vicré M, Jauneau A, Knox JP, Driouich A (1998) Immunolocalization of beta-(1 -> 4) and beta-(1 -> 6)-D-galactan epitopes in the cell wall and Golgi stacks of developing flax root tissues. *Protoplasma* **203**: 26-34.
- Vincken, J.P., Schols, H.A., Oomen, R.J., F.J., Beldman, G., Visser, R.G.F., and Voragen, A.G.J. (2003). "Pectin—the hairy thing," in *Advances in Pectin and Pectinase Research*, eds A.G. J. Voragen, H. Schols and R. Visser (Dordrecht: Kluwer Academic Publishers), p 47–59.
- Willats, W.G., McCartney, L., Mackie, W., and Knox, J.P. (2001) Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Mol. Biol.* **47**: 9–27.
- Willats, W.G., Marcus, S.E. and Knox, J.P. (1998) Generation of monoclonal antibody specific to (1 to 5)-alpha-L-arabinan. *Carbohydr. Res.* **308**: 149–152.
- 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.

^a Monosaccharide composition (%)

Ara	38.8 ± 4.0
GalUA	20.8 ± 0.4
Rha	18.0 ± 0.6
Gal	11.8 ± 0.8
Xyl	6.9 ± 1.4
Fuc	1.7 ± 0.3
Man	1.7 ± 0.2
GlcUA	0.3 ± 0.1

^b Linkage analysis (%)

T-Araf	14.3
3-Araf	1.9
5-Araf	22.9
3,5-Araf	15.7
T-Galp	3.6
3-Galp	3.9
4-Galp	7.5
6-Galp	0.4
3,6-Galp	0.8
4,3-Galp	nd
4,6-Galp	1.2
T-Rhap	0.2
2-Rhap	3.2
3-Rhap	0.2
2,4-Rhap	3.6
2,3,4-Rhap	0.6
T-Xylp	3.8
2-Xylp	3.8
2,3,4-Xylp	0.9
T-Glcp	2.0
3-Glcp	2.3
4,6-Glcp	5.9

Table 1: Monosaccharide composition and linkage analysis of the pectin-enriched fraction. (a) The monosaccharide composition was determined by GLC analysis of trimethylsilyl methylglycosides and expressed as mol %. Values are means ± SEM from three independent experiments. (b) The sugar linkage analysis was determined by GLC-EIMS of partially methylated alditol acetate and expressed as mol %. nd: not detected. Ara: Arabinose; Fuc: Fucose; Gal: Galactose; GalUA: Galacturonic acid; Glc: Glucose; GlcUA: Glucuronic acid; Rha: Rhamnose; Xyl: Xylose.

Antibody	Reference	Epitope
INRA-RU1	Ralet <i>et al.</i> , 2010	[→2)-α-L-rhamnose <i>p</i> -(1→4)-α-D-galacturonic acid <i>p</i> -(1→] _{6/7}
INRA-RU2	Ralet <i>et al.</i> , 2010	[→2)-α-L-rhamnose <i>p</i> -(1→4)-α-D-galacturonic acid <i>p</i> -(1→] _{2/7}
LM13	Moller <i>et al.</i> , 2008; Verhertbruggen <i>et al.</i> , 2009	[unbranched α(1-5) arabinan] _{5/11}
LM6	Willats <i>et al.</i> , 1998	[α(1-5) arabinan] _{5/6}
LM16	Verhertbruggen <i>et al.</i> , 2009	Galactosyl residue/galactan stub between arabinan chain and RGI backbone
LM5	Jones <i>et al.</i> , 1997	[unbranched β(1-4) galactan] _{>3}

Table 2: Antibodies used in this study. Mouse monoclonal antibodies, INRA-RU1 and INRA-RU2 are specific for the backbone of RG-I. Rat monoclonal LM13 and LM6 antibodies bind arabinan side chains, whereas LM5 and LM16 recognize galactan and arabinogalactan branching respectively.

(a)	Wild-type cells without primary antibody			Wild-type cells with primary antibody			Total observed gold particles	
	Compartment	Observed gold particles	Expected gold particles	χ^2 values	Observed gold particles	Expected gold particles		χ^2 values
	<i>Cis</i>	10	3.82	9.99	9	15.17	2.51	19
	<i>Medial</i>	15	7.64	7.08	23	30.35	1.78	38
	<i>Trans</i>	3	3.82	0.17	16	15.17	0.04	19
	<i>TGN</i>	9	21.71	7.44	99	86.28	1.87	108
	Column totals	37		24.70	147		6.21	184

(b)	Compartment	Observed gold particles, n_o	Observed points, p	Expected gold particles, n_e	RLI n_o/n_e	χ^2	χ^2 %
	<i>Cis</i>	9	1314	35.8	0.25	18,57	32.02
	<i>Medial</i>	23	1579	43.0	0.54	9,29	14.85
	<i>Trans</i>	16	423	11.5	1.39	1,75	2.79
	<i>TGN</i>	99	2084	56.7	1.75*	30,02	50.34*
	Column totals	147	5400	147			

Table 3: Quantitative analysis of LM6 labelling over Golgi stacks in wild-type tobacco BY-2 suspension-cultured cells. (a) Comparison of gold particle distribution within Golgi subcompartments of wild-type cells immunolabelled with or without the primary antibody LM6. Quantification of labelling was done on 55 Golgi stacks for each line. The total χ^2 value (24.70+6.21=30.91) compared to that of contingency table analysis, with a degree of freedom of 3, confirms that gold particles distribution is due to LM6 with $\alpha < 0.005$. (b) Observed and expected distribution of gold particles in subtypes of Golgi cisternae of wild-type tobacco BY-2 suspension-cultured cells and relative labelling index values. Asterisks (*) identify Golgi compartments that are preferentially labelled.

(a)	Wild type cells			Transformed cells			Total observed gold particles	
	Compartment	Observed gold particles	Expected gold particles	χ^2 values	Observed gold particles	Expected gold particles		χ^2 values
	<i>Cis</i>	61	51.60	1.71	88	97.39	0.90	149
	<i>Medial</i>	42	95.93	30.32	235	181.06	16.06	277
	<i>Trans</i>	37	27.01	3.69	41	50.98	1.95	78
	<i>TGN</i>	91	56.45	21.14	72	106.54	11.20	163
	Column totals	231		56.86	436		30.12	667

(b)	Compartment	Observed gold particles, n_o	Observed points, p	Expected gold particles, n_e	RLI n_o/n_e	χ^2	χ^2 %
			<i>Cis</i>	88	728	39.2	2.24
	<i>Medial</i>	235	1286	69.2	3.39*	52,54	53.05*
	<i>Trans</i>	41	444	23.9	1.71	1,88	1.90
	<i>TGN</i>	72	1354	72.8	0.98	44,34	44.76
	Column totals	436	3812	205			

Table 4: Quantitative analysis of anti-GFP labelling over Golgi stacks in tobacco BY-2 suspension-cultured cells expressing AtARAD1-GFP. (a) Comparison of gold particle distribution within Golgi subcompartments of wild-type and transformed cells (expressing AtARAD1-GFP) of BY-2 suspension-cultured cells. Quantification of labelling was done on 50 Golgi stacks for each line. The total χ^2 value ($56.86 + 30.12 = 86.98$) compared to that of contingency table analysis, with a degree of freedom of 3, confirms specificity of gold particle distribution between wild-type and transformed cells with $\alpha < 0.005$. (b) Observed and expected distribution of gold particles in subtypes of Golgi cisternae of tobacco BY-2 suspension-cultured cells expressing AtARAD1-GFP and relative labelling index values. Asterisks (*) identify Golgi compartments that are preferentially labelled.

Golgi compartment labeled	Antibody used	Corresponding epitope detected	Possible reaction occurring in this compartment
cis	PGA/RG-I	Transition region between deesterified HG and the first Rha linked residue of RG-I	<ul style="list-style-type: none"> • Association of HG and RG-I backbone • Initiation of RG-I backbone synthesis
medial	PGA/RG-I	Transition region between deesterified HG and the first Rha linked residue of RG-I	<ul style="list-style-type: none"> • Elongation of RG-I backbone
	INRA-RU1	6 to 7 [GalUA /Rha] units which are unbranched, non-methylated and non-acetylated	
trans	PGA/RG-I after deesterification treatment	Transition region between deesterified HG and the first Rha linked residue of RG-I	<ul style="list-style-type: none"> • Methylesterification of GalA
	LM13	Long (5 to 11 Ara), unbranched and linear arabinan chain	<ul style="list-style-type: none"> • Elongation of (1→5)-α-L-arabinan chain
TGN	PGA/RG-I after deesterification treatment	Transition region between deesterified HG and the first Rha linked residue of RG-I	<ul style="list-style-type: none"> • (Methylesterification of GalA ?)
	LM5	Short (4 Gal) galactan chain	<ul style="list-style-type: none"> • Elongation of galactan chain
	LM6	Short (2 to 6 Ara), possibly branched and non linear arabinan chain	<ul style="list-style-type: none"> • Branching of linear arabinan chain with 2- or 3-linked arabinose
	LM16	Galactosyl residue/galactan stub between arabinan chain and RG-I backbone	<ul style="list-style-type: none"> • Branching of branched arabinan on galactose residue or galactan stub to form arabinogalactan chain

Table 5: A proposed pathway RG-I synthesis and assembly in the Golgi apparatus. PGA/RG-I epitopes were detected in sycamore maple suspension-cultured cells (Zhang and Staehelin, 1992; Driouich et al., 1993). Here, quantitative immunogold analysis (see also table 3) of INRA-RU1, LM5, LM6, LM13 and LM16 was performed in tobacco BY-2 suspension-cultured cells (deep squares). First, data suggest that RG-I backbone synthesis is initiated in the *cis* Golgi subcompartment, extends in the *medial* subcompartment, and that arabinan and galactan or arabinogalactan side chains elongation occurs at least in the *trans* Golgi subcompartment and the TGN respectively. And, secondly, data confirm that the methylesterification of galacturonic acid residues takes place in the late Golgi compartment.

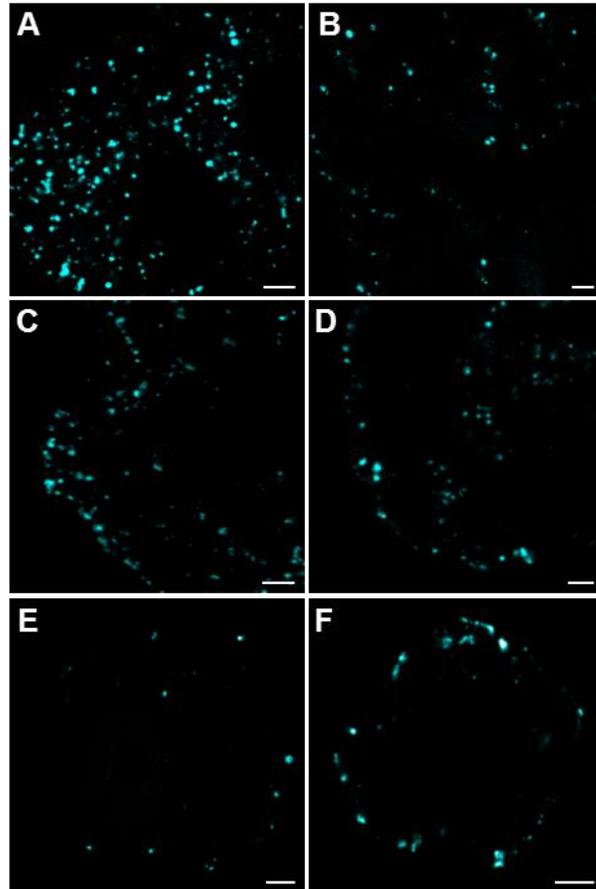


Figure 1: Confocal microscope images showing subcellular localization of rhamnogalacturonan-I epitopes within tobacco BY-2 protoplasts. Fluorescent spots ($\sim 1\mu\text{m}$ in diameter), that are typical of Golgi localization, are observed following labelling with INRA-RU1 (A), INRA-RU2 (B), LM5 (C), LM6 (D), LM13 (E) and LM16 (F). Scale bar = $5\mu\text{m}$.

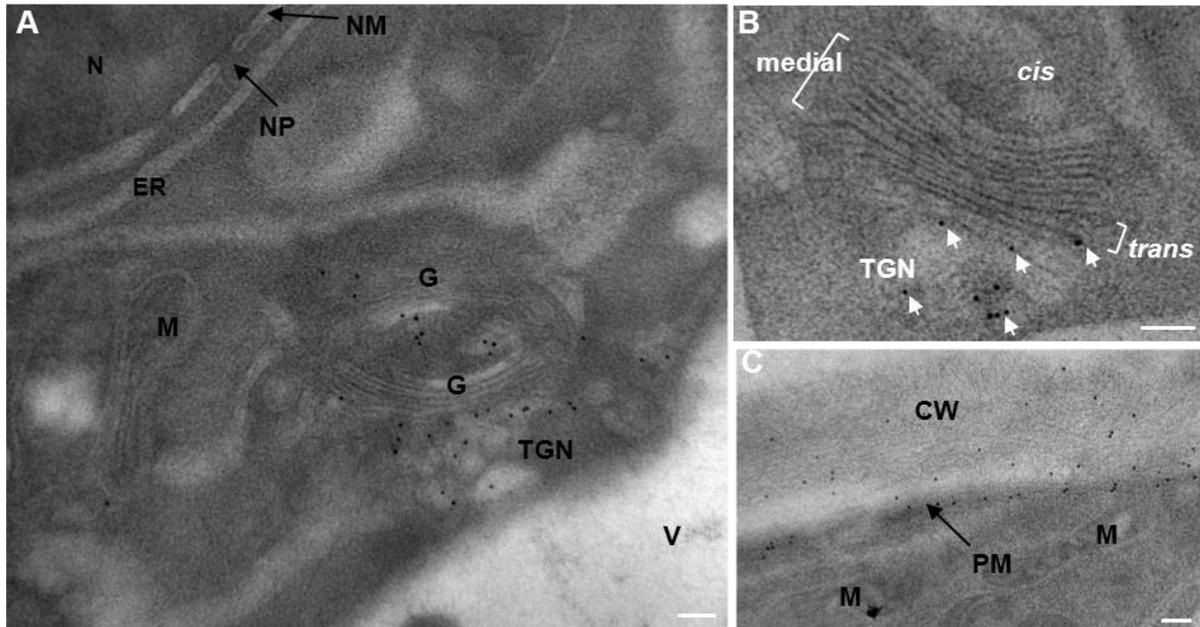


Figure 2: Immunogold localization of rhamnogalacturonan-I epitopes in HPF/FS tobacco BY-2 suspension-cultured cells. Electron micrographs illustrate labelling of Golgi units and secretory vesicles with the monoclonal antibody LM6 (A), and of Golgi stacks and the cell wall with the monoclonal antibody LM 16 (B, C). White arrows indicate gold particles in B. CW : cell wall, ER : endoplasmic reticulum, G : Golgi stacks, M : mitochondria, N, nucleus; NM : nuclear membrane, NP : nuclear pore, PM : plasma membrane; TGN : trans-Golgi network; V, vacuole. Scale bars = 100 nm.

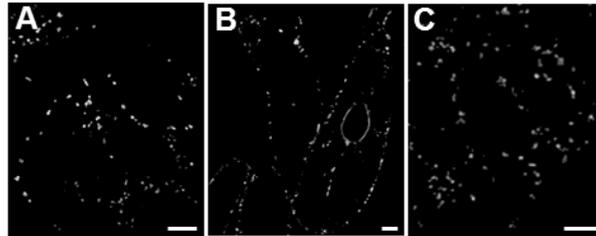


Figure 3

Figure 3: Distribution of AtARAD1-GFP, AtUXE1/MUR4-GFP, and AtUXE3-GFP in living tobacco BY-2 suspension-cultured cells. Stable expression of AtARAD1-GFP (A), AtUXE1/MUR4-GFP (B), and AtUXE3-GFP (C) in tobacco BY-2 suspension-cultured cultured cells also shows fluorescent spots typical of Golgi localization. Scale bars : 8 μ m.

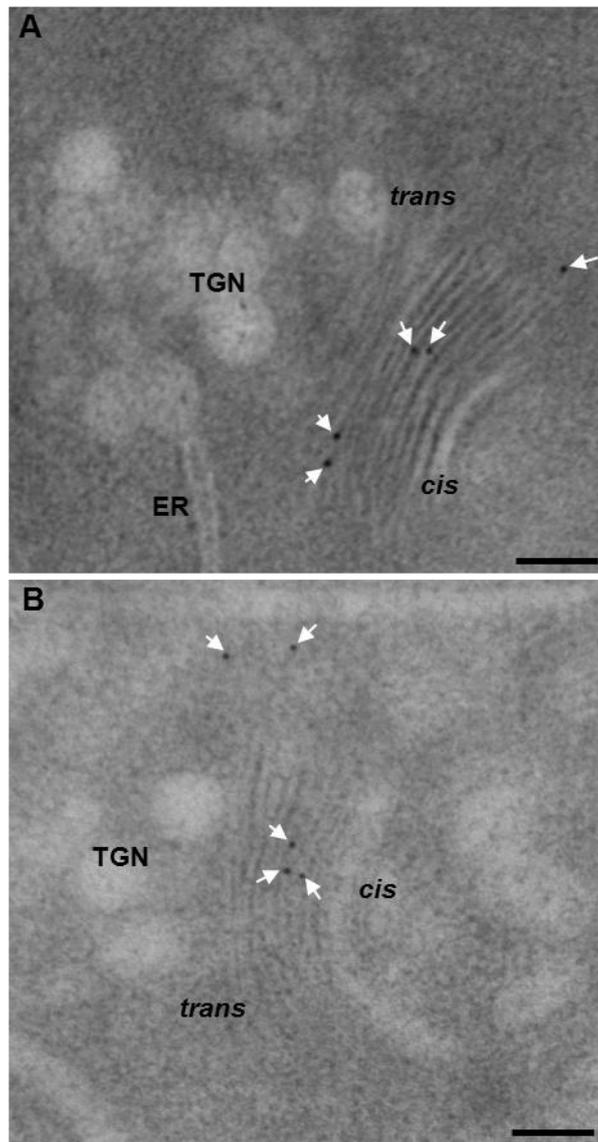


Figure 4: Immunogold localization of AtARAD1-GFP, AtUXE1/MUR4-GFP, and AtUXE3-GFP fusion protein in Golgi stacks of transformed tobacco BY-2 suspension-cultured cells with anti-GFP antibodies. ER, endoplasmic reticulum; TGN, *trans*-Golgi network. Arrows indicate gold particles. Scale bars: 100 nm.

Type of test	Line	Bait (Cub)	Prey (Nub)	Droptest	X
Bait functionality test	1	AtARAD1-BT3-N	pOst1-Nubl		
	2	AtRGP1-DHB1	pOst1-Nubl		
	3	AtRGP2-DHB1	pOst1-Nubl		
	4	AtUXE3-DHB1	pOst1-Nubl		
Bait randomly interaction test	5	AtARAD1-BT3-N	pPR3-N		
	6	AtRGP1-DHB1	pPR3-N		
	7	AtRGP2-DHB1	pPR3-N		
	8	AtUXE3-DHB1	pPR3-N		
Prey randomly interaction test	9	AtXXT2-BT3-N	AtARAD1-PR3-N		
	10	AtXXT2-BT3-N	AtRGP1-PR3-N		
	11	AtXXT2-BT3-N	AtRGP2-PR3-N		
	12	AtXXT2-BT3-N	AtUXE3-PR3-N		
Interaction test	13	AtARAD1-BT3-N	AtARAD1-PR3-N		
	14	AtARAD1-BT3-N	AtRGP1-PR3-N		
	15	AtARAD1-BT3-N	AtRGP2-PR3-N		
	16	AtARAD1-BT3-N	AtUXE3-PR3-N		
Interaction test	17	AtRGP1-DHB1	AtARAD1-PR3-N		
	18	AtRGP1-DHB1	AtRGP1-PR3-N		
	19	AtRGP1-DHB1	AtRGP2-PR3-N		
	20	AtRGP1-DHB1	AtUXE3-PR3-N		
Interaction test	21	AtRGP2-DHB1	AtARAD1-PR3-N		
	22	AtRGP2-DHB1	AtRGP1-PR3-N		
	23	AtRGP2-DHB1	AtRGP2-PR3-N		
	24	AtRGP2-DHB1	AtUXE3-PR3-N		
Interaction test	25	AtUXE3-DHB1	AtARAD1-PR3-N		
	26	AtUXE3-DHB1	AtRGP1-PR3-N		
	27	AtUXE3-DHB1	AtRGP2-PR3-N		
	28	AtUXE3-DHB1	AtUXE3-PR3-N		

Figure 5: Droptest and X-gal assay used to detect protein-protein interaction using the split-ubiquitin system between AtARAD1, AtRGP1, AtRGP2 and AtUXE3. Transformed yeast containing the indicated combinations of bait and prey proteins were spotted in equal concentrations on SD-His-Leu-Trp-Ade plates in a dilution series from 1x, 10x, 100x, to 1000x and incubated at 30°C for 3 days. Growth on SD-His-Leu-Trp-Ade plates indicates that two proteins of a given combination are interacting. X-Gal assay test for β -galactosidase activity, which is a reporter for interaction upon blue color formation. The baits when co-expressed with pOst1-Nubl tests for functionality and when co-expressed with PR3-N tests for random interaction. The preys when co-expressed with the type II membrane protein AtXXT2 tests for random interaction.



Root border cells and secretions as critical elements in plant host defense

Azeddine Driouch¹, Marie-Laure Follet-Gueye¹,
Maité Vicré-Gibouin¹ and Martha Hawes²

Border cells and border-like cells are released from the root tip as individual cells and small aggregates, or as a group of attached cells. These are viable components of the root system that play a key role in controlling root interaction with living microbes of the rhizosphere. As their separation from root tip proceeds, the cells synthesize and secrete a hydrated mucilage that contains polysaccharides, secondary metabolites, antimicrobial proteins and extracellular DNA (exDNA). This exDNA-based matrix seems to function in root defense in a way similar to that of recently characterized neutrophil extracellular traps (NETs) in mammalian cells. This review discusses the role of the cells and secreted compounds in the protection of root tip against microbial infections.

Addresses

¹Laboratoire Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale (EA 4358), Grand Réseau de Recherche VASI « Végétal-Agronomie-Sols et Innovations » et Plate Forme d'Imagerie Cellulaire (PRIMACEN) de Haute Normandie. Université de Rouen, 76821 Mont Saint Aignan Cedex, France

²Soil, Water and Environmental Sciences Department, University of Arizona, Tucson, AZ 85721, United States

Corresponding author: Driouch, Azeddine (azeddine.driouch@univ-rouen.fr)

Current Opinion in Plant Biology 2013, 16:489–495

This review comes from a themed issue on **Biotic interactions**

Edited by **Beverley Glover** and **Pradeep Kachroo**

For a complete overview see the [Issue](#) and the [Editorial](#)

Available online 12th July 2013

1369-5266/\$ – see front matter, © 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2013.06.010>

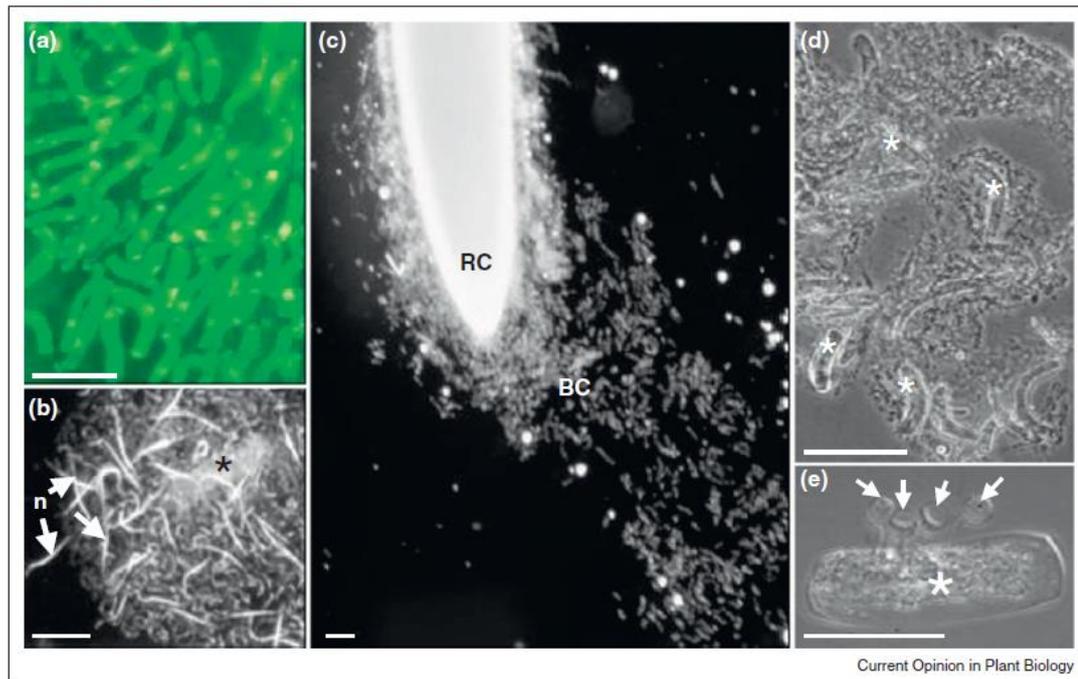
Introduction

Maintaining a healthy root within the soil is vitally important for plant growth and crop protection. During root growth, root cap turnover and programmed cell separation from the cap periphery results in the delivery of detached cell populations into the rhizosphere [1,2]. These are termed root border cells or root border-like cells depending on the pattern of their release and organization [3^{**},4]. Border cells are defined as cells that detach from the root cap as individual cells and small aggregates, whereas border-like cells are released as blocks or sheets of cells that remain attached to each other [1,4].

Interestingly, the production of border cells appears to be correlated to mycorrhizal associations with the root. Plant species that have a higher mycorrhizal propensity release larger numbers of border cells than those with lesser mycorrhizal propensity [5,6] although the role of border cells in the establishment of mycorrhizal colonization is not known. A number of studies have provided evidence that border cells (Figure 1a,c) can influence root-rhizosphere dynamics at the root tip. First, the number of border cells increases in response to pathogens and other stimuli including carbon dioxide, metals, soil type and secondary metabolites [2,8,9]. Second, border cells are capable of attracting or repelling pathogenic microorganisms including nematodes (Figure 1b), bacteria (Figure 1d) and oomycetes (Figure 1e). For example, instantaneous attraction of zoospores to border cells, but not root surfaces, occurs in a host-microbe specific manner (Figure 1e) (see [12], supplementary Figures 1–4). Exposure of pea roots to the pathogen *Nectria haematococca* results in the formation of a mantle of hyphae, mucilage and border cells that covers the root tip [13]. Remarkably, the moving root tip remains free of infection once the mantle has been detached and left behind. Third, border cells secrete antimicrobial proteins, phytoalexins, arabinogalactan proteins and pectins within the extracellular matrix or 'slime' [9,14,15,16^{**},17^{**}]. The slime layer and its responses to stimuli can be visualized using India ink, which does not penetrate the matrix (Figure 2). Border cells from pea emerge from the root tip ensheathed within a slime layer measuring several millimeters in diameter (Figure 2b). Individual border cells from maize (Figure 2a) and pea (Figure 2c) respond to the presence of bacteria and germinating fungal spores by increased slime production [18].

It has been recently found that pea root border cells secrete DNA to the matrix (exDNA) much like the NETs 'neutrophil extracellular traps' reported by Brinkmann et al. in 2004 [19^{**}] to be released by white blood cells in mammals [19^{**},20,21^{**},22]. ExDNA-based extracellular traps have now been shown to underlie critical aspects of mammalian immune responses ranging from infectious disease to lupus and other autoimmune disorders as well as heart attacks, stroke, and skin diseases (summarized in Table 1). These emerging discoveries offer revolutionary insights into previously unrecognized disease processes and offer new avenues for clinical approaches to human health and wellness [31,32^{**}]. Here, we outline recent

Figure 1



Dispersal dynamics of pea border cells in response to immersion in water for 30 seconds (c). Viability of border cells is shown using the vital stain fluorescein diacetate (a). Root knot nematodes added to the suspension are chemotactically attracted to border cells, and form aggregates where nematode mobility ceases (b) [7]. *Agrobacterium tumefaciens* added to pea border cells (d), and *Pythium dissotocum* zoospores added to cotton border cells exhibit similar behavior (e) [10,11]. Arrows in (b) point to nematodes and in (e) to zoospores attached to a border cell. RC, root cap; BC, border cells (also indicated by *); n, nematodes. Bars: 20 μm .

advances from studies on the role of these secretions on root health.

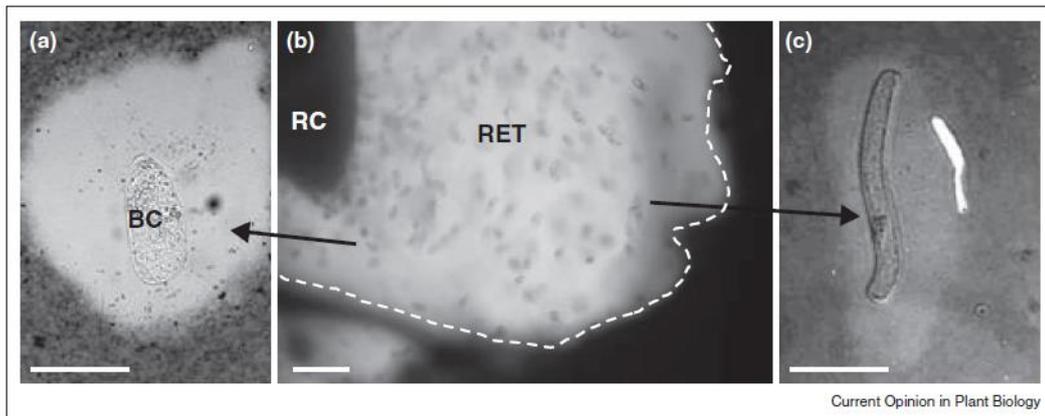
Secretion of high molecular weight cell wall glycomolecules, pectin and arabinogalactan proteins

Pectin impacts border cell separation. Release of border cells is dependent on the activity of pectin-degrading enzymes such as methylsterases and polygalacturonases responsible for their separation from the root tip [33,34]. The cells are released individually or as aggregates, depending on species, genotype, and environmental conditions [3^{**},30,35]. The cell walls of border cells and border-like cells contain significant amounts of pectic polysaccharides including homogalacturonan and xylogalacturonan [3^{**},17^{**},36]. Both pectin types are also found in the secreted mucilage surrounding the root cap. Interestingly, in the *Arabidopsis Quasimodo 1-1* mutant that is deficient in homogalacturonan biosynthesis, border-like cells are released as individual border cells further supporting the role of pectin in their attachment and separation. Border cells of *Quasimodo 1-1* mutant also secrete abundant mucilage in which they remain enclosed thus forming a matrix that resembles biofilm secretions of bacteria. Such

a 'border cell biofilm' is also present in pea, rice, maize and other species [15,35,37,38]. The biofilm not only contains pectin, but also a number of antimicrobial proteins ([15] and see below). Xylogalacturonan is another pectic polysaccharide that is abundantly secreted by root cap and border cells [17^{**},36,39]. Structurally xylogalacturonan is a homogalacturonan in which the galacturonan backbone is substituted with Xyl residues. Xylogalacturonan is more resistant to digestion by pectin-degrading enzymes such as polygalacturonases known to be produced by plant pathogens during infection [40^{*}]. This is most likely because of the xylose-containing side chains of the polysaccharide. Consistent with this is the observation that the expression of the XGD1 gene responsible for the addition of xylose to xylogalacturonan backbone increases in response to many pathogens including *Phytophthora infestans* and *Pseudomonas syringae* [40^{*}].

Arabinogalactan proteins impact interaction with microbes. Border cells and border-like cells also make arabinogalactan proteins [3^{**},17^{**}]. These are found in their cell walls but also abundantly secreted into the extracellular matrix [17^{**},36]. Plant arabinogalactan proteins

Figure 2



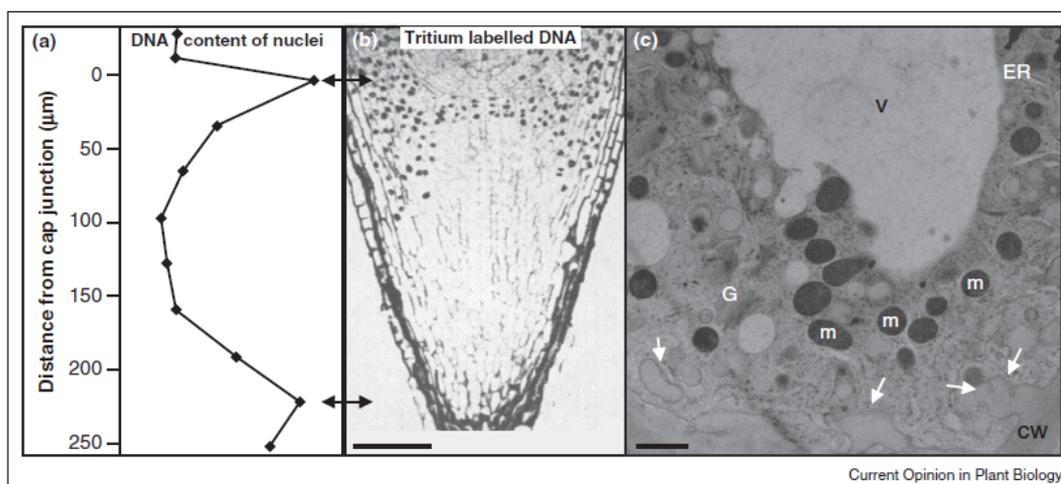
Visualization of root extracellular 'trap' (RET) surrounding the root cap (b) using India ink (dashed lines surround RET). Induced trap formation on single cells (black arrows) in response to *Pseudomonas aeruginosa* (a) and a germinating spore of *Fusarium solani f. sp. pisi* (c). BC, border cell; RC, root cap; RET, root extracellular trap. Bars: 20 μm .

Table 1

Recognizing a role for exDNA-based trapping in immune responses: timeline.

	Animals		Plants
Brinkmann et al. (2004) [19**]	Neutrophil extracellular traps (NETs) contain DNA, histones and antimicrobial proteins. Pathogens are attracted to NETs where they aggregate and are killed. Trapping is reversed by addition of exogenous DNase.	Wen et al. (2007) [15]	A secretome of >100 extracellular proteins is exported from living cells at the root cap periphery into the environment. When degraded, root cap resistance to fungal infection is abolished. Histone H ₄ is among the secreted proteins.
Alghamdi and Foster (2005) [23]	Seminal DNase frees spermatozoa entangled in NETs.	Wen et al. (2009) [21**]	Extracellular histone occurs in association with exDNA. Addition of exogenous DNase I at the time of inoculation with a fungal pathogen results in an increase in root tip infection from <5% to 100%.
Sumby et al. (2005) [24] Buchanan et al. (2006) [25]	DNase mutant GAS strains exhibit impaired virulence in association with reduced degradation of NETs.	Curlango-Rivera et al. (2011) [12]	Bacteria are chemotactically attracted to border cells, which trap and immobilize the bacteria within minutes. Adding DNase within 30 minutes results in reversal of trapping and release of the bacteria, which swim away. New traps are produced by the plants cells, and trapping is restored.
Urban et al. (2006) [26] Guimaraes-Costa et al. (2009) [27]	Both yeast and hyphal forms of <i>Candida albicans</i> , as well as protozoan pathogens, also are killed by NETs.	Cannesan et al. (2011) [9]	Phytoalexin, pisatin is synthesized and secreted by border cells into the extracellular traps (ETs).
Fuchs et al. (2010) [22]	Extracellular DNA traps promote thrombosis.	Cannesan et al. (2012) [17**]	Pathogenic oomycetes are chemotactically attracted to border cells and immobilized via secreted arabinogalactan proteins that occur in the ET.
Young et al. (2011) [28]	Defective local NET-mediated killing of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> occurs in cystic fibrosis.	Curlango-Rivera et al. (2013) [30]	Treatment of pea roots with a compost water extract results in altered distribution of border cells, with development of a sheath of cells and microbes covering the root tip, and is associated with 100% protection against fungal infection. No sheath develops, and no protection occurs in cucumber inoculated with a related fungal pathogen. 'Trapping' of extracellular traps may yield a new avenue for crop protection.
McDonald et al. (2012) [29]	Intravascular NETs capture bacteria from the bloodstream during sepsis.		

Figure 3



DNA synthesis in cells of the root cap periphery of *Zea mays* (a) [50] and *Convolvulus* (b) [51], and visualization of secretory vesicles within detached border cells of pea (c). DNA synthesis in meristematic cells at the cap junction (top double arrow) of the two species is evident by increased nuclear DNA content (a) and dark staining of cells with tritium labeling (b). A similar increase is evident within cells of the cap periphery (bottom double arrow) using both methods: increased DNA content within cells (a); and increased tritium label within cells and apoplast (b). (c) Electron micrograph showing secretory vesicles (white arrows) fusing with the plasma membrane in a pea border cell. Note the presence of numerous Golgi stacks (G) and mitochondria (M) attesting of the high metabolic activity of border cells during their release. CW, cell wall; ER, Endoplasmic reticulum; G, Golgi; M, mitochondria; v, vacuole; Bars: 50 µm (b), 1 µm (c).

are complex proteoglycans highly enriched in Ara and Gal, two sugar residues that have been found in the root exudates of many species [38,41,42]. Arabinogalactan proteins are 'adhesive-like' molecules that may participate physically in building and maintaining the integrity of the biofilm. But, they are functionally important as regulators of the interaction between root and microbes of the rhizosphere. For example, arabinogalactan proteins secreted by pea root border cells prevent germination of zoospores of *Aphanomyces euteiches*, a pathogenic oomycete responsible for pea root rot disease [17**]. The zoospores also are selectively attracted and encysted (loss of flagella) by the same population of arabinogalactan proteins. Attraction of zoospores by border cells and their secretions have also been observed for the pathosystem cotton-*Pythium dissotocum* [12]. Attachment and infection of root cells by soil-borne bacteria have also been found to be dependent on secreted arabinogalactan proteins in two examples. First, the *rat1* mutant of *Arabidopsis* deficient in arabinogalactan-protein 17 is resistant to infection by *Agrobacterium tumefaciens* [43**] and, second, alteration of arabinogalactan proteins using the β -Glc Yariv a probe known to bind specifically to arabinogalactan-proteins [44] results in an inhibition of binding of a rhizobacterium and *A. tumefaciens* to *Arabidopsis* root tips [3**,43**]. A recent study has also shown that polar attachment of *Rhizobium leguminosorum* to pea root tips is mediated by an arabinogalactan-like protein of the mucilage [45**]. Arabinogalactan proteins are able to bind calcium and

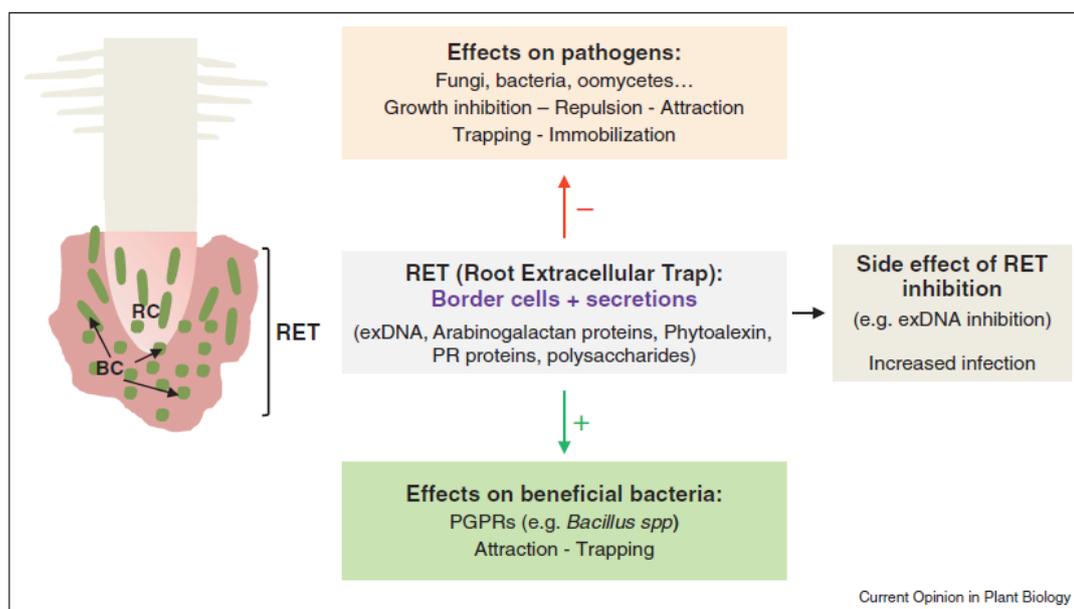
have been recently proposed as 'calcium capacitors' involved in calcium-based signal transduction during cell growth [46]. It is therefore tempting to speculate that this also occurs during perception of microbial signals by root cells to regulate root defense capacities.

Arabinogalactan proteins appear as critical elements for host defense within the extracellular slime; but pectin, phenolics, antimicrobial proteins and exDNA (see below) are also part of the complex [9,21**]. These molecules are predicted to act synergistically to promote an effective protection of the root.

Secretion of Proteins and exDNA by root border cells

In addition to the high molecular weight polysaccharide components of root cap slime, a group of >100 proteins is synthesized and exported into the extracellular matrix [15,47]. The secretome includes structural and antimicrobial proteins long known to be present within the apoplast of diverse plant tissues [48,49]. Thus, it was not surprising that adding protease to the root tip at the time of inoculation with a fungal pathogen eliminates resistance to infection, and that antibody to a single component, 14-3-3 protein, significantly increases disease severity [15]. The novel discovery that H4 histone was also among the secreted proteins led to a recognition of parallels with an emerging story from mammalian systems: In 2004, histone-linked exDNA as an integral

Figure 4



Root extracellular trap (RET) is formed by border cells and secreted antimicrobial components, arabinogalactan proteins, ExDNA, etc. Experimental evidence indicates that the trap is able to alter microbial behavior in many ways to ensure root protection and create stable changes within the rhizosphere. Inhibition of RET formation results in severe infection. BC, border cells; ExDNA, extracellular DNA; PR proteins, pathogenesis-related proteins; PGPR, plant growth promoting rhizobacteria; RC, root cap.

component of innate immunity was reported by Brinkmann et al. [19^{**}], who described neutrophil extracellular traps (NETs) for the first time. It is now clear that exDNA-based ‘trapping’ plays a critical role in cellular defense in animals, and that microbial expression of extracellular DNase (exDNase) is a key virulence factor in pathogenesis [31,32^{**}] (Table 1).

As in white blood cells, histone secreted from the root cap and border cells proved to be a marker for the presence of exDNA required for extracellular trapping [2,20,21^{**}]. The trapping response is reversed by adding DNase I to the border cell-pathogen complex and DNase-based reversal of trapping is correlated with loss of root tip resistance to infection [21^{**}]. The results highlight the critical importance of the extracellular complex of proteins and exDNA in root cap slime, and the need for further research to describe how these polymers interact to protect plant tissues from injury and infection. Fortunately, classical studies of root cap function provide strong hints regarding the synthesis of DNA and other polymers exported from the root cap into the extracellular ‘slime’. For example, Clowes [50] reported an increase in DNA at the periphery of the root cap, in the absence of changes in ploidy levels (Figure 3a). Phillips and Torrey [51], using tritium labeled thymidine to measure cell cycle within the root meristem, also found newly labeled

DNA in peripheral cells of the root cap and the apoplast (Figure 3b). The authors noted that the basis for this phenomenon was unknown, but the delivery of exDNA from living cells indicates that the process does not necessarily involve programmed cell death processes that have been proposed to occur in mammalian NET development [52]. Direct microscopic observation of the root cap cellular structures (Figure 3c) has revealed that transfer of labeled material from hypertrophied dictyosomes within the cell to the extracellular matrix occurs within 15–20 minutes [53]. These values are consistent with observations that root cap turnover, with delivery of a new set of border cells and slime, can be induced non-destructively within minutes by immersing in water, or by transient exposure to diverse signals [2,54]. Border cell viability is 95–100% in cereals and legumes, and a high rate of metabolic activity can be measured using *in vivo* labeling of proteins and polysaccharides [47]: Newly labeled proteins can be detected within minutes, and >10% of the proteins synthesized within border cells are secreted during a one-hour period when no cell death occurs. The same approaches can be used to define mechanisms underlying exDNA delivery.

Conclusions

In plants and animals, understanding how disease occurs or is circumvented is a fundamental underpinning to

developing methods for prevention and control. Microbial trapping by components of the extracellular matrix of higher plants is a mechanism whose significance has been overlooked in the past. Recognition of the process in mammals has yielded new insight into virtually all aspects of human health and disease [31,32**]. Efforts to utilize these insights to protect patients from death and disability are well underway [32**]. As in the mammalian immune response, the RET (Root Extracellular Trap) is able to interfere with pathogen development (see model in Figure 4) and, therefore, appears as a critical element for root immunity and protection. Plant pathogenic bacteria and fungi surveyed have all been found to produce exDNases, and characterization of their impact on virulence will be a critical step in understanding the trapping process in plants [20]. The first step in exploiting RETs to develop methods to improve crop production will be an increased focus on scientific studies to define the process.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge support of our research on *Root Protection* by the University of Arizona and the National Science Foundation (USA), the University of Rouen and Grand Réseau de Recherche VASI « Végétal-Agronomie-Sols et Innovations » de Haute Normandie (France). Jean-Selim Driouich, a student at the faculty of Pharmacy (Rouen University) is acknowledged for stimulating discussion on the diversity of human pathogens and immunity.

References and recommended reading

Papers of particular interest, published within the period of review, have been highlighted as:

- of special interest
 - of outstanding interest
1. Hamamoto L, Hawes MC, Rost TL: **The production and release of living root cap border cells is a function of root apical meristem type in dicotyledonous angiosperm plants.** *Ann Bot* 2006, **97**:917-923.
 2. Hawes MC, Curlango-Rivera G, Xiong Z, Kessler JO: **Roles of root border cells in plant defense and regulation of rhizosphere microbial populations by extracellular DNA 'trapping'.** *Plant Soil* 2012, **355**:1-15.
 3. Vitré 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.
- This paper was the first to describe the occurrence of atypical border cells in the plant model *Arabidopsis thaliana*. Because of their unusual organization as compared to 'classical' border cells such as those described in pea, these cells were termed 'root border-like cells'. The authors demonstrated that these cells were still living after their release from the root cap. To date, the function of root border-like cells remains to be clearly established.
4. Driouich A, Durand C, Cannesan MA, Percoco G, Vitré-Gibouin M: **Border cells versus border-like cells: are they alike?** *J Exp Bot* 2010, **61**:3827-3831.
 5. Niemira BA, Safir GR, Hawes MC: **Arbuscular mycorrhizal colonization and border cell production: a possible correlation.** *Phytopathology* 1996, **86**:563-565.
 6. Nagahashi G, Douds DD: **Isolated root caps, border cells, and mucilage from host roots stimulate hyphal branching of the arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora gigantea*.** *Mycol Res* 2004, **108**:1079-1088.
 7. Zhao X, Schmitt M, Hawes MC: **Species-dependent effects of border cell and root tip exudates on nematode behavior.** *Phytopathology* 2000, **90**:1239-1245.

8. Zhao X, Misaghi IJ, Hawes MC: **Stimulation of border cell production in response to increased carbon dioxide levels.** *Plant Physiol* 2000, **122**:181-186.
 9. Cannesan MA, Gangneux C, Lanoue A, Giron D, Laval K, Hawes M, Driouich A, Vitré-Gibouin M: **Association between border cell responses and localized root infection by pathogenic *Aphanomyces euteiches*.** *Ann Bot* 2011, **108**:459-469.
 10. Goldberg NP, Hawes MC, Stanghellini ME: **Specific attraction to and infection of cotton root cap cells by zoospores of *Pythium dissotocum*.** *Can J Bot* 1989, **67**:1760-1767.
 11. Hawes MC, Smith LY: **Requirement for chemotaxis in pathogenicity of *Agrobacterium tumefaciens* on roots of soil-grown pea plants.** *J Bacteriol* 1989, **171**:5668-5671.
 12. Curlango-Rivera G, Hawes MC: **Root tips moving through soil – an intrinsic vulnerability.** *Plant Signal Behav* 2011, **6**:1-2.
 13. Gunawardena U, Rodriguez M, Straney D, Romeo JT, VanEtten HD, Hawes MC: **Tissue specific localization of root infection by *Nectria haematococca*: mechanisms and consequences.** *Plant Physiol* 2005, **137**:1363-1374.
 14. Barlow PW: **The root cap: cell dynamics, cell differentiation and cap function.** *J Plant Growth Regul* 2003, **21**:261-286.
 15. Wen F, VanEtten HD, Tsapralis G, Hawes MC: **Extracellular proteins in *Pisum sativum* L. root tip and border cell exudates.** *Plant Physiol* 2007, **143**:773-783.
 16. De-la-Pena C, Lei Z, Watson BS, Sumner LW, Vivanco JM: **Root-microbe communication through protein secretion.** *J Biol Chem* 2008, **283**:25247-25255.
- Using a proteomic approach, the authors have shown that the compatible interaction between *A. thaliana* and *P. syringae* DC3000 induces the specific secretion of many plant proteins related to defense (e.g. chitinases, glucanases, etc.). These proteins are not secreted in the incompatible interaction of *A. thaliana* with *S. melliloti*.
17. Cannesan MA, Durand C, Burel C, Follet-Gueye ML, Lerouge P, Ishii T, Driouich A, Vitré-Gibouin M: **Effect of arabinogalactan-proteins from root caps of *Pisum sativum* and *Brassica napus* on *Aphanomyces euteiches* zoospore chemotaxis and germination.** *Plant Physiol* 2012, **159**:1658-1670.
- The authors demonstrate that arabinogalactan-proteins isolated from pea root caps and root border cells selectively induce chemotaxis and regulate early root infection by the pathogen *Aphanomyces euteiches*. This is the first report that documents the role of arabinogalactan-proteins in the interaction of roots with soilborne pathogenic oomycetes.
18. Wen F, Curlango-Rivera G, Hawes MC: **Proteins among the polysaccharides: a new perspective on root cap slime.** *Plant Signal Behav* 2007, **2**:6.
 19. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A: **Neutrophil extracellular traps kill bacteria.** *Science* 2004, **303**:1532-1535.
- This paper documents for the first time, by using direct microscopic observation of form and function, that neutrophils employ an exDNA-based extracellular trapping process to immobilize and inactivate pathogenic bacteria.
20. Hawes MC, Curlango-Rivera G, Wen F, White G, VanEtten H, Xiong Z: **Extracellular DNA: the tip of root defenses?** *Plant Sci* 2011, **180**:741-745.
 21. Wen F, White GA, Xiong Z, VanEtten HD, Hawes MC: **Extracellular DNA is required for root tip resistance to fungal infection.** *Plant Physiol* 2009, **151**:820-829.
- This paper made the exciting discovery that extracellular DNA is present in root cap slime of pea. ExDNA was previously reported to play a key role in the immune response of mammalian cells against pathogens. This paper is the first report on the presence of extracellular DNA in plants. The data demonstrate that exDNA in root exudates is a major component of root defense.
22. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD Jr, Wroblewski SK, Wakefield TW, Hartwig JH, Wagner DD: **Extracellular DNA traps promote thrombosis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107**:15880-15885.
 23. Alghamdi AA, Foster DN: **Seminal DNase frees spermatozoa entangled in NETs.** *Biol Reprod* 2005, **73**:1174-1181.

24. Sumbay P, Barbican KD, Gardner DJ, Whitney AR, Welty DM, Long RD, Bailey JR, Parnell MJ, Hoe NP, Adams GG, DeLeo FR, Musser JM: **Extracellular DNase made by group A *Streptococcus* assists pathogenesis by enhancing evasion of the innate immune response.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**:1679-1684.
25. Buchanan JT *et al.*: **DNase expression allows the pathogen Group A *Streptococcus* to escape killing in neutrophil extracellular traps.** *Curr Biol* 2006, **16**:396-400.
26. Urban CF, Reichard U, Brinkmann V, Zychlinsky A: **Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms.** *Cell Microbiol* 2006, **8**:668-676.
27. Guimaraes-Costa AB, Nascimento MTC, Froment GS, Soares RPP, Morgado FN, Conceição-Silva F, Elvira M, Saraiva EM: ***Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**:6748-6753.
28. Young RL, Malcolm KC, Kret JE, Caceres SM, Poch KR, Nichols DP, Taylor-Cousar JL, Saavedra MT, Randell SH, Vasil ML *et al.*: **NET-mediated killing of *Pseudomonas aeruginosa*: evidence of acquired resistance within the CF airway, independent of CFTR.** *PLoS ONE* 2011, **6**:e23637.
29. McDonald B, Urrutia R, Yipp BG, Jenne CN, Kubers P: **Intravascular NETs capture bacteria from the bloodstream during sepsis.** *Cell Host Microbe* 2012, **12**:324-333.
30. Curlango-Rivera G, Pew T, VanEtten HD, Zhongguo X, Yu N, Hawes MC: **Measuring root disease suppression in response to a compost water extract.** *Phytopathology* 2013, **103**:255-260.
31. Medina E: **Neutrophil extracellular traps: a strategic tactic to defeat pathogens with potential consequences for the host.** *J Innate Immun* 2009, **1**:176-180.
32. Saffarzadeh M, Preissner KT: **Fighting against the dark side of NETs in disease: manoeuvres for host protection.** *Curr Opin Hematol* 2013, **20**:3-9.
- This paper summarizes research findings that have emerged from research programs throughout the world in the eight years since extracellular trapping was first described. The authors succinctly highlight clinical implications of the discoveries that exDNA-based extracellular trapping underlies immune and autoimmune function in ways not previously recognized.
33. Stephenson MB, Hawes MC: **Correlation of pectin methyltransferase activity in root caps of pea with border cell separation.** *Plant Physiol* 1994, **106**:739-745.
34. Wen F, Zhu Y, Hawes MC: **Expression of a pectinmethyltransferase-like gene in pea root tips influences extracellular pH, cell morphology and border cell separation.** *Plant Cell* 1999, **11**:1129-1140.
35. Endo I, Tange T, Osawa H: **A cell type specific defect in border cells formation in the *Acacia mangium* root cap developing and extraordinary sheath of sloughed-off cells.** *Ann Bot* 2011, **108**:279-290.
36. Durand C, Vitré-Gibouin M, Follet-Gueye ML, Duponchel L, Moreau M, Lerouge P, Driouch A: **The organization pattern of root border-like cells of *Arabidopsis thaliana* is dependent on cell wall homogalacturonan.** *Plant Physiol* 2009, **150**:1411-1421.
37. Cai MZ, Zhang SN, Xing CH, Wang FM, Wang N, Zhu L: **Developmental characteristics and aluminium resistance of root border cells in rice seedlings.** *Plant Sci* 2011, **180**:702-708.
38. Knee EM, Gong FC, Mensheng G, Teplitski M, Jones AR, Foxworthy A, Mort AJ, Bauer WD: **Root mucilage from pea and its utilization by rhizosphere bacteria as a sole carbon source.** *Mol Plant Microbe Interact* 2001, **14**:775-784.
39. Willats WGT, McCartney L, Steele-King CG, Marcus SE, Mort A, Huisman M, Van Alebeek GJ, Schols HA, Voragen AGJ, Le Goff A, Bonnín E, Thibault JF, Knox JP: **A xylogalacturonan epitope is specifically associated with plant cell detachment.** *Planta* 2004, **218**:673-681.
40. Jensen JK, Sorensen SO, Harholt J, Geshi N, Sakuragi Y, Møller I, Zandleven J, Bernal AJ, Jensen NB, Sorensen C, Pauly M, Beldman G, Willats WGT, Scheller HV: **Identification of a xylogalacturonan xylosyltransferase involved in pectin biosynthesis in *Arabidopsis*.** *Plant Cell* 2008, **20**:1289-1302.
- The paper describes an arabidopsis mutant with decreased XGA and the identification of a xylosyltransferase responsible for XGA biosynthesis. The authors suggest a function of XGA in resistance to pathogen attack as XGD1/mRNA is increased in response to several pathogens like *Botrytis cinerea*/*Phytophthora infestans*, and *Pseudomonas syringae* and when syringolin and methyl-jasmonate are applied.
41. Ellis M, Egelund J, Schultz CJ, Bacic A: **Arabinogalactan-proteins: key regulators at the cell surface?** *Plant Physiol* 2010, **153**:403-419.
42. Nguema-Ona E, Vitré-Gibouin M, Cannesan MA, Driouch A: **Arabinogalactan proteins in root-microbe interactions.** *Trends Plant Sci* 2013 <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2013.03.006>.
43. Gaspar YM, Nam J, Schultz CJ, Lee LY, 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.
- This paper provides strong evidences that arabinogalactan proteins are essential in root-microbes interaction.
44. Kitazawa K, Tryfona T, Yoshimi Y, Hayashi Y, Kawauchi S, Antonov L, Tanaka H, Takahashi T, Kaneko S, Dupree P, Tsumuraya Y, Kotake T: **β -Galactosyl Yariv reagent binds to the β -1,3-galactan of arabinogalactan proteins.** *Plant Physiol* 2013, **161**:1117-1126.
45. Xie F, Williams A, Edwards A, Downie JA: **A plant arabinogalactan-like glycoprotein promotes a novel type of polar surface attachment by *Rhizobium leguminosarum*.** *Mol Plant Microbe Interact* 2012, **25**:250-258.
- The authors purified a factor from pea root exudates of pea that impacts polar attachment of *Rhizobium leguminosarum* to the root tip. The factor was characterized and found to be an arabinogalactan protein. This work provides evidence that arabinogalactan proteins are involved in the establishment of bacteria-root attachment and symbioses.
46. Lamport D, Vamai P: **Periplasmic arabinogalactan glycoproteins act as calcium capacitor that regulates plant growth and development.** *New Phytol* 2013, **197**:58-64.
47. Brigham LA, Woo HH, Nicoll SM, Hawes MC: **Differential expression of proteins and mRNAs from border cells and root tips of pea.** *Plant Physiol* 1995, **109**:457-463.
48. Van Loon LC, van Kammen A: **Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var 'samsun' and Samsun NN. II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus.** *Virology* 1970, **40**:199-211.
49. Van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ: **Significance of inducible defense-related proteins in infected plants.** *Ann Rev Phytopathol* 2006, **44**:135-162.
50. Clowes FAL: **The DNA content of the cells of the quiescent center and root cap of *Zea mays*.** *New Phytol* 1968, **67**:631-639.
51. Phillips HL, Torrey JG: **Deoxyribonucleic acid synthesis in root cap cells of cultured roots of *Convolvulus*.** *Plant Physiol* 1971, **2**:213-218.
52. Brinkmann V, Zychlinsky A: **Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs.** *Nat Rev Microbiol* 2007, **5**:577-582.
53. Barlow PB: **The root cap.** In *The Development and Function of Roots*. Edited by Torrey JG, Clarkson DT. London: Academic Press; 1975.
54. Curlango-Rivera G, Duclos D, Eboho JJ, Hawes MC: **Transient exposure of root tips to primary and secondary metabolites: impact on root growth and production of border cells.** *Plant Soil* 2010, **332**:367-375.

Isolation of human epidermal layers by laser capture microdissection: application to the analysis of gene expression by quantitative real-time PCR

Giuseppe Percoco¹, Magalie Bénard², Yasmina Ramdani¹, Elian Lati³, Luc Lefevre⁴, Azeddine Driouch^{1,2} and Marie-Laure Follet-Gueye^{1,2}

¹Glycobiology and Plant Extracellular Matrix (GlycoMEV) Laboratory, UPRES EA 4358, IFRMP 23, University of Rouen, Mont-Saint-Aignan, France; ²The Cell Imaging Platform of Normandy (PRIMACEN), IFRMP23, University of Rouen, Mont-Saint-Aignan, France; ³BIO-EC laboratory, Longjumeau, France; ⁴Laboratoires Dermatologique d'Uriage, Courbevoie, France

Correspondence: Marie-Laure Follet-Gueye, PhD, GlycoMEV, UPRES EA 4358, IFRMP 23, University of Rouen, Bâtiment Henri Gadeau de Kerville, Place Emile Blondel, 76821 Mont-Saint-Aignan Cedex, France, Tel.: (33)2-35-14-00 39, Fax: (33)2-35-14-66-15, e-mail: marie-laure.follet-gueye@univ-rouen.fr

Abstract: We describe, for the first time, an efficient protocol based on laser capture microdissection (LCM) for the isolation of human epidermal layers for gene expression profiling using quantitative real-time PCR. Two areas enriched either in basal or granular layers were isolated by LCM. Skin biopsies were fixed in dry ice-cooled isopentane, cryosectioned and stained before the laser procedure. High-quality total RNA was extracted from each microdissected sample, which allowed the analysis of the spatial distribution of mRNA transcripts from 10 innate immunity-related genes within the epidermal layers. Using integrin alpha-6/ integrin beta-4 and corneodesmosin/filaggrin-2 sets as gene markers for the basal and granular layers, respectively, we showed

that Toll-like receptor 2, RNase 7, human beta-defensin-2 and -3, psoriasis and nucleotide-binding oligomerization domain 1 are upregulated in the suprabasal layer of normal human epidermis. Our protocol, which is based on the rapid isolation of epidermal layers, can be used to follow transcriptional processes in specific areas of the epidermis and is a very promising tool to use in the study of numerous aspects of dermatology.

Key words: gene expression – human epidermis – laser capture microdissection – quantitative real-time PCR

Accepted for publication 11 April 2012

Introduction

The skin is a stratified tissue that comprises three main compartments: the epidermis, the dermis and the hypodermis. The epidermis provides the organism with a multiple barrier, including water loss prevention (1) and defense against abiotic (2, 3) and biotic stresses (4–6). It consists of four distinct keratinocyte layers: the stratum basale (SB), the stratum spinosum (SP), the stratum granulosum (SG) and the uppermost stratum corneum (SC). During their journey from the SB to the SC, keratinocytes differentiate and sequentially turn on and off a series of specific genes. Most of them remain to be described. To identify new genes/proteins acting in this differentiation programme and to better understand the nature of the epidermal natural barrier, it is a crucial step to accurately isolate the various epidermis layers and extract the corresponding mRNAs. So far, different methods have been used to perform dermo-epidermal separation (7–9). Clemmensen et al. (7) improved a protocol that was based on the incubation of full-thickness skin biopsies with ammonium thiocyanate to obtain microarray data specific for epidermal cells. Toulza et al. (8) developed an original method that combined thermolysin treatment with trypsin digestion of the epidermis to investigate the patterns of gene expression profiling across the epidermis.

Laser capture microdissection (LCM) is a technique that allows an area of interest to be isolated from a heterogeneous tissue (10). During recent years, LCM has been applied to different fields of dermatological research, including the study of skin ageing (11), investigation of the effects of ultraviolet (UV) irradiation (12), research on cutaneous melanoma (13–15) and hair biology

research (16,17). To date, few studies have been devoted to the separation of the epidermal layers by LCM (12, 18). Here, we describe an optimized protocol for the preparation of samples by LCM. The protocol allowed the isolation of two human epidermal fractions that were enriched in keratinocytes from the SB and SG and could be used for downstream analysis like gene expression profile by quantitative real-time PCR (qPCR). This method could be applied to different aspects of dermatological research.

Materials and methods

Human skin explants

Normal human skin biopsies were obtained from patients undergoing cosmetic surgery procedures, after they had provided informed consent. The study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki. The explants used were obtained after plastic surgery on healthy female donors aged 31–61 years. Abdominal area explants were derived from three different donors, whereas explants from internal thigh, external thigh and buttock areas were sourced from a single donor. The subcutaneous fat was removed from the skin, and the explants of approximately 1 cm in diameter were excised using a circular scalpel. The explants were placed in BIO-EC's explant medium (BEM) and cultured at 37°C in 5% CO₂. Half of the medium was replaced with fresh medium every 2 days.

Preparation of the sample for laser capture microdissection

Data S1 the skin explants were fixed in dry ice-cooled isopentane and stored at –80°C until sectioning. The frozen samples were sectioned (12–14 μm sections) on a cryostat (Leica CM1950; Leica, Rueil-Malmaison, France) and transferred to glass slides that were coated with poly-ethylene-naphthalene (PEN, Membrane

Slide 1.0 PEN; Carl Zeiss, Le Pecq, France) and had been treated previously with RNase Zap (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) and activated by exposure to UV. The sections were fixed in 70% ethanol for 10 s and stained successively with a classical haematoxylin and eosin (H&E) protocol. Briefly, the sections were stained by immersion in modified Harris haematoxylin solution (Sigma-Aldrich) for 1 min and then rinsed in 100% ethanol before staining in Eosin Y (Sigma-Aldrich) for 30 s. Just before the LCM procedure, the samples were dehydrated for a few seconds with increasing concentrations of ethanol (70 and 100%).

Laser capture microdissection

The LCM was performed using a Palm Robot MicroBeam apparatus (Carl Zeiss), by applying a pulsed UVA laser beam (focal spot $<1 \mu\text{m}$) through an inverted microscope with an $\times 20$ objective. After microdissection, keratinocytes from the SB- and SG-enriched fractions were collected by catapulting them into a tube cap of a tube that contained $34 \mu\text{l}$ of RLT lysis buffer (Qiagen, Courtaboeuf, France) with 1% β -mercaptoethanol (Sigma-Aldrich). For the study, we isolated two fractions from four explants of different origin using LCM.

RNA extraction, assessment of quality and reverse transcription

Total RNA was extracted using an RNeasy Micro kit (Qiagen) in accordance with the manufacturer's instructions. The RNA was eluted with $10 \mu\text{l}$ of RNase-free water. DNase I treatment (RNase-Free DNase Set; Qiagen) was performed to remove contaminating genomic DNA. The quality of the RNA was assessed, and the quantity was estimated by microfluidic capillary electrophoresis (Agilent 2100 Bioanalyzer; Agilent Technologies, Massy, France). Approximately 5 ng of RNA were reverse-transcribed in a 20-ml reaction that contained $5\times$ QuantiTect Buffer, RT Primer Mix and QuantiTect Reverse Transcriptase from a QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen).

Quantitative real-time PCR

Amplification reactions were performed using a 7500 Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) in a final reaction volume of $13 \mu\text{l}$, which contained $2\times$ SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems), 300 nM forward and reverse primers and the template cDNA. The thermal cycling conditions involved a denaturation step at 95°C for 20 s, followed by 40 cycles of amplification at 95°C for 3 s and 60°C for 30 s. The final dissociation step was performed at 95°C for 15 s, 60°C for 1 min, 95°C for 15 s and 60°C for 15 s. When possible, intron-spanning primers (Table S1) were designed using Primer Express 3.0 software (Applied Biosystems). The efficiency and specificity of each of the primers were verified accurately (Figs S1 and S2).

Selection of reference genes

Reference genes were selected using two different VBA applets: GeNorm (version 3.5) (19) and NormFinder (version 20) (20).

Statistical analysis

The ratio in gene expressions between SB- and SG-enriched fractions was determined using $\Delta\Delta C_t$ methods and were calculated using the SB expression profile as a reference, except for integrin α -6, integrin β -4 and keratin 14 for which the SG expression profile was used as a reference. The data from each experiment were analysed statistically by Student's t-test (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA; www.graphpad.com). Differences were considered statistically significant when $P \leq 0.05$.

Results

Preparation of skin biopsies for LCM

The choice of fixation protocol is crucial to preserve the optimal RNA integrity required for downstream molecular analysis. First, we compared four different methods of skin fixation (Table S2). The results showed that the use of dry ice-cooled isopentane ensured the integrity of the nucleic acids and resulted in an RNA integrity number (RIN) of 8.1 (Table S2).

In parallel, accurate visualization of the tissue is essential to recognize different layers of the epidermis, and a staining protocol that does not interfere with the preservation of RNA integrity is required. To this end, four staining protocols were tested (Table S2). The best results were obtained using H&E staining, which had very little effect on RNA integrity (Table S2). Fixation with cold isopentane coupled with H&E staining, which allowed the optimal tissue preservation necessary for the recognition of the different epidermal layers, was adopted (Fig. 1).

We also determined that RNA extraction should be performed within 30 min after cryosectioning to avoid any RNA degradation (Fig. 2). Otherwise, we established the optimal size of the area to be microdissected and optimal relative thickness of the sections. Fine sections ($\leq 10 \mu\text{m}$) showed a better morphological structure, but a larger amount of material was required for the downstream analysis of gene expression. To isolate the SB-enriched fraction, sections that were $14\text{-}\mu\text{m}$ thick were selected to identify the epidermal layers and to collect a sufficient amount of material. We established that an area of $0.5\text{-}0.7 \text{ mm}^2$ was required to detect gene expression by qPCR (corresponding to $1148 \pm 416.8 \text{ pg}/\mu\text{l}$ of mRNA in this fraction). In contrast, the SG is connected closely with the SC, the layer of the epidermis that is rich in extracellular matrix, which means that it is more difficult to isolate by LCM. For this reason, we prepared areas of $0.8\text{-}1 \text{ mm}^2$ from sections that were $12\text{-}\mu\text{m}$ thick to isolate the SG (corresponding to $972.1 \pm 198.8 \text{ pg}/\mu\text{l}$ of mRNA in this fraction).

In addition, to avoid degradation of the sample, we recommend using fresh lysis buffer for each microdissected section collecting the resulting material in separate Eppendorf tubes and combining the total sample at the end of the experiment.

Analysis of epidermal layer-specific gene expression by qPCR

After LCM, the gene expression profile of each fraction obtained was investigated using qPCR. First, we analysed the expression of 10 reference genes (Table S3), and we showed that the genes encoding the ribosomal proteins RPL13A and RPLP0 (Fig. S3) were the best reference genes. However, to avoid redundancy of the findings, which would have resulted from using two reference genes that both encoded ribosomal proteins, we used RPLP0 and B2M, which was the third highest scoring reference gene. To validate our method for the separation of epidermal layers by LCM, we analysed the gene expression profiles of 10 structure-related genes. The expression and spatial distribution of these structural proteins, which included desmoglein-1 (dsg-1) (21), keratin 14 (22), filaggrin-2 (FLG-2) (23) and integrins (24), across the epidermal layers are reasonably well characterized, which allowed us to interpret the results relatively easily. As expected, all the structural genes analysed showed a distinct expression pattern in the SB- and SG-enriched fractions (Fig. 3a). Three genes, keratin 14, integrin α -6 and integrin β -4, showed significant upregu-

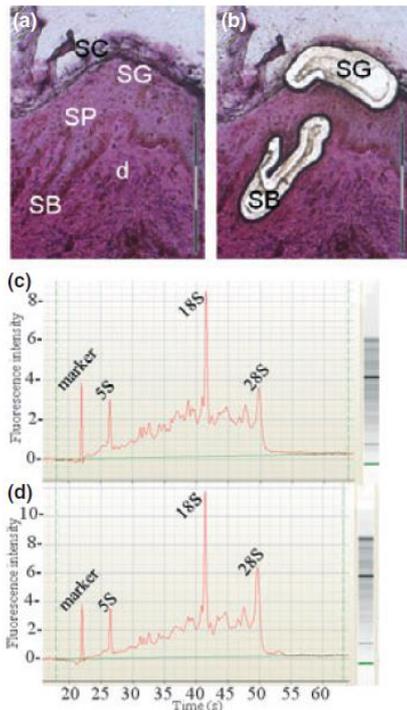


Figure 1. Isolation of epidermal layers by laser capture microdissection (LCM) and assessment of RNA quality. Sections (12–14 μm in thickness) were stained with H&E before LCM processing. As shown in (a), the different layers of the human epidermis were clearly visible, which allowed the isolation of two fractions enriched in keratinocytes from the basal and granular layers. The RNA from the microdissected tissues was analysed subsequently by microfluidic capillary electrophoresis. As shown in the respective electropherograms, both basal (c) and granular (d) layer-enriched fractions showed a satisfactory preservation of RNA, resulting in a RNA integrity number of 5.7 ± 0.4 (c) and 5.5 ± 0.4 (d), respectively. The ribosomal subunits 5S, 18S and 28S are clearly identifiable. d, dermis; SB, stratum basale; SC, stratum corneum; SG, stratum granulosum; SP, stratum spinosum. Scale bar: 150 μm .

lation in the basal layer, whereas the expression of claudin-4, FLG-2 and comeodesmosin (CDSN) was strongly upregulated in the upper layers of the epidermis. In subsequent expression analysis, we decided to use integrin α -6 and integrin β -4 as markers of the SB-enriched fraction and FLG-2 and CDSN for the SG-enriched fraction to validate the correct isolation of the area of interest by LCM. These results were confirmed using explants sampled from different body sites (Fig. S4). We also analysed the expression of 10 defense-related genes (Fig. 3b), and we showed that the expression of most of them was upregulated significantly in the SG layer of the epidermis. Other defensive genes studied in this work did not show any difference of expression between the two layers. The levels of expression of these defense-related genes were also analysed using biopsies of different origins and the same trend was observed (Fig. S5). We confirmed this spatial distribution across the epidermal layers at protein level by immunostaining (Data S2 and Fig. S6).

Discussion

The epidermis plays key roles in skin barrier function, including waterproofness (1), defense against environmental stresses (2–6) and wound healing (25, 26). In this pluristratified epithelium,

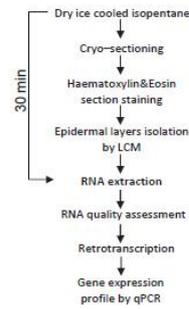


Figure 2. Protocol for analysis of gene expression using human skin biopsy specimens subjected to laser capture microdissection. To maintain acceptable integrity of nucleic acids, the microdissected area of interest should be collected in lysis buffer within 30 min after cryosectioning.

keratinocyte proliferation occurs only in the basal layer whereas these cells differentiate throughout their journey in the spinous and granular layer. Moreover, the epidermal layers contribute differently to the defense against pathogens because of the specific localization of antimicrobial peptides (AMPs) (4, 27) and TLRs (28, 29). For isolation of the epidermis, several protocols based on chemical methods (9), compatible with qPCR analysis, have been described. Alternatively, Yazdi et al. (30) have optimized an LCM-based method to microdissect epidermal cells suitable for DNA but not RNA extraction. Ruetze et al. (18) have improved a protocol for extraction from specific epidermal cells, but without performing gene expression profiling by qPCR. Here, we optimized an LCM-based protocol to isolate for the first time two fractions

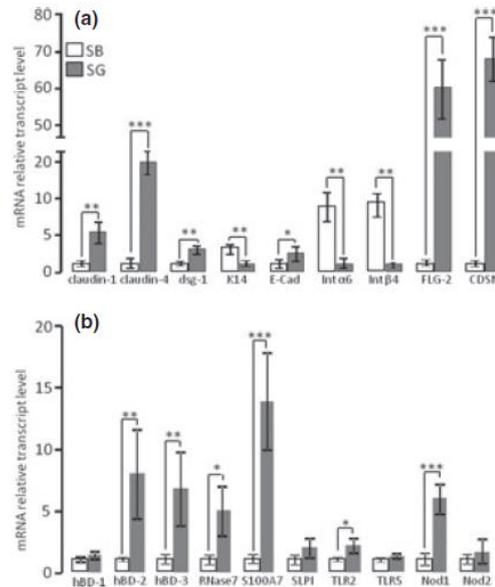


Figure 3. Gene expression analysis across epidermal layers. Fractions enriched in the basal layer or granular layer were analysed by qPCR to quantify the expression of structure-related (a) and defense-related (b) genes. Statistically significant differences were observed for both structural and defense-related genes. Except for K14, integrin α -6 and integrin β -4, all the other structural genes were expressed specifically in the fraction enriched for the granular layer. Similarly, the majority of the genes implicated in the innate immunity were upregulated in the suprabasal layers of the epidermis. Three different biopsies from three different female donors were microdissected ($N = 3$), and three explants for each donor have been processed ($n = 9$). *** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$.

enriched in keratinocytes from either the basal or granular epidermal layers. The technique is compatible for subsequent molecular analysis by qPCR. Different methods of fixation, including the use of alcohol-based agents such as methanol and ethanol (31, 32), cross-linking reagents such as formalin (33–35) or dithio-bis succinimidyl propionate (DSP) (36) and cryomethods, such as plunging into liquid nitrogen (12, 13, 37), have been employed previously for sample preparation. These approaches affect RNA integrity differently. In this study, we showed that fixation of the skin with cold isopentane, coupled with H&E staining, ensured the highest quality of total RNA. However, we observed that when very small areas of epidermis, such as a specific layer, were micro-dissected, RIN values decreased significantly without affecting the qPCR analysis. The ratios, in the expression of the genes used as marker for each fraction, ≥ 10 -fold for integrin $\alpha 6$ /integrin $\beta 4$ and ≥ 60 -fold for CDNS/FLG-2, demonstrated the efficacy of LCM method to isolate the SB from the SG. We then used the cDNA produced from both fractions to analyse the levels of mRNA of genes related to innate immunity encoding for several AMPs, TLRs and Nod receptors. We showed that, in healthy human skin, the expression of hBD-2 and -3, RNase 7, psoriasis and the receptors TLR2 and Nod1 was predominant in the uppermost layers of the epidermis, which confirmed that their expression is related to the degree of differentiation of the keratinocytes as previously described (5, 38–40). A similar expression profile was observed using biopsy sampled from other body sites (internal and external thigh and buttock).

The LCM protocol described here allowed the isolation of different layers of the human epidermis and provided high-quality RNA compatible with gene expression profiling by qPCR. Our method might represent a valid support for immunohistochemical analysis and could be used to elucidate the transcriptional mechanism involved in the cutaneous response to environmental stress factors or that related to a particular pathological state.

Acknowledgements

This work was supported by 'Le Pôle de compétitivité de la Cosmetic Valley' and the 'FEDER' (Fonds Européens de Développement Régional) in the frame of 'Skinoflor' project. Images and data were obtained on PRIMACEN (<http://primacen.crihan.fr>): The Cell Imaging Platform of Normandy, SFR IRIB, Faculty of Science, University of Rouen 76821 Mont Saint Aignan. We thank Dr. Chloé Merle-Choinard from Bio-EC Laboratory, Lonjumeau, France for the preparation of the human skin explants. Thanks are also due to Dr. M. Simon from University of Toulouse for his critical reading of the manuscript.

G. Percoco, Y. Ramdani and M. Bénard performed the research, G. Percoco, M-L. Follet-Gueye, A. Driouich, L. Lefeuvre and E. Lati designed the research study, M. Bénard and E. Lati contributed essential reagents and tools, G. Percoco, M. Bénard, M-L. Follet-Gueye and Y. Ramdani analysed the data, and G. Percoco, M-L. Follet-Gueye and A. Driouich wrote the paper.

The study was carried out following the ethical policies of Experimental Dermatology. The BioEC laboratory possesses an authorization from French minister of health and research.

Conflict of interest

The authors have declared no conflicting interests.

References

- Proksch E, Brandner M J, Jensen J M. *Exp Dermatol* 2008; **17**: 1063–1072.
- Drexler H. *Int Arch Occup Environ Health* 2003; **76**: 359–361.
- De Luca C, Valacchi G. *Mediat Inflamm* 2010; **2010**: 321494.
- Sørensen O E, Thapa R D, Rosenthal A *et al.* *J Immunol* 2005; **174**: 4870–4879.
- Gläser R, Harder J, Lange H *et al.* *Natur Immunol* 2005; **6**: 57–64.
- Zanger P, Holzer J, Schleucher R *et al.* *Inv Dermatol* 2009; **200**: 1907–1915.
- Clemmensen A, Thomassen M, Clemmensen O *et al.* *Exp Dermatol* 2009; **18**: 979–984.
- Toulza E, Mattiuzzo N R, Galliano M F *et al.* *Genome Biol* 2007; **8**: R107.
- Trost A, Bauer W J, Christoph Lanschützer C *et al.* *Exp Dermatol* 2007; **16**: 185–190.
- Espina V, Wulfkühle J D, Calvert V S *et al.* *Nat Protoc* 2006; **1**: 586–603.
- Lochner K, Gaemlich A, Süde K M *et al.* *Biogerontology* 2007; **8**: 269–282.
- Agar N S, Halliday G M, Barnetson R *et al.* *PNAS* 2004; **101**: 4954–4959.
- Wang Y, DiGiovanna J J, Stern J B *et al.* *PNAS* 2009; **106**: 6279–6284.
- Greene V R, Johnson M M, Grimm E A *et al.* *J Inv Dermatol* 2009; **129**: 1483–1488.
- Moussai D, Mitsui H, Pettersen J *et al.* *J Inv Dermatol* 2011; **131**: 229–236.
- Ariza de Schellenberger A, Horland R, Rosowski M, Paus R, Lauster R, Lindner G. *Exp Dermatol* 2011; **20**: 361–366.
- Xu X, Lyle S, Liu Y, Solky B, Cotsarelis G. *Am J Pathol* 2003; **163**: 969–978.
- Ruetze M, Lochner M, Gallinat S, Knott A. Analysis of Tissue-Specific Gene Expression Using Laser Capture Microdissection. In: Turksen K, ed. *Epidermal Cells, Methods in Molecular Biology* 2nd edn. Ottawa Hospital Research Center, Ottawa, 2010: 183–192.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F *et al.* *Genome Biol* 2002; **3**: 1–11.
- Andersen C L, Jensen J L, Orntoft T F. *Cancer Res* 2004; **64**: 5245–5250.
- Boschini E, Dellavia C, Barajon I, Gagliano N. *Arch Dermatol Res* 2005; **297**: 31–38.
- Coulombe P A, Kopan R, Fuchs *et al.* *E J Cell Biol* 1989; **109**: 2295–2312.
- Wu Z, Hansmann B, Meyer-Hoffert U, Gläser R, Schröder J M. *PLoS One* 2009; **4**: e5227.
- Hertle M D, Adams J C, Watt F M *et al.* *Development* 1991; **112**: 193–206.
- Cavani A, Zambruno G, Marconi A, Manca V, Marchetti M, Giannetti A. *J Inv Dermatol* 1993; **101**: 600–604.
- Havran V L, Jameson J M. *J Immunol* 2010; **184**: 5423–5428.
- Gläser R, Harder J, Hans Lange H, Bartels J, Christophers E, Schröder J M. *Nat Immunol* 2005; **6**: 57–64.
- Miller L, Sørensen O E, Liu P T *et al.* *J Immunol* 2005; **174**: 6137–6143.
- Pivarsci A, Bodai L, Reàthi B *et al.* *Int Immunol* 2003; **15**: 721–730.
- Yazdi A S, Puchta U, Flaig M J, Christian A, Sander C A. *J Cut Pathol* 2004; **31**: 465–470.
- Gillespie J W, Best C J M, Bichsel V E *et al.* *Am J Pathol* 2002; **160**: 449–457.
- Wang S, Wang L, Zhu T *et al.* *BMC Genomics* 2010; **11**: 163–176.
- Pagedar N A, Wang W, Chen D H C *et al.* *Brain Res* 2006; **1091**: 289–299.
- Jiang R, Scott R S, Hutt-Fletcher L M. *Methods Mol Biol* 2011; **755**: 77–84.
- Burgemeister R. *Methods Mol Biol* 2011; **724**: 117–119.
- Xiang C C, Mezey E, Chen M, Key S, Ma L, Brownstein M. *J Nucleic Acids Res* 2004; **32**: 185–193.
- Carneiro J R, Fuzii H T, Kayser C *et al.* *Clinics* 2011; **66**: 77–82.
- Kim E J, Kim B J, Jeong M S *et al.* *J Korean Med Sci* 2005; **20**: 649–654.
- Köten B, Simanski M, Gläser R, Podschun R, Jens-Michael Schröder J M, Harder J. *PLoS One* 2009; **4**: e6424.
- Liu A Y, Destoumieux D, Wong A V *et al.* *J Inv Derm* 2002; **118**: 275–281.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Data S1. To compare the effect of different fixation protocols on RNA integrity, four different fixatives were tested.

Data S2. Frozen skin biopsies were cut by cryostat on 8 μ m thick sections.

Figure S1. Amplification plot (a), standard curve (b) and dissociation curve (c) of RLP0 gene.

Figure S2. Amplification plot (a), standard curve (b) and dissociation curve (c) of hBD2 gene.

Figure S3. Selection of reference genes.

Figure S4. Gene expression profile of structure-related genes.

Figure S5. Gene expression profile of defense-related genes.

Figure S6. Immunostaining of structural and defensive proteins in frozen skin sections.

Table S1. Accession numbers, primer sequences and the expected size of amplicons.

Table S2. Assessment of the quality of RNA extracted from whole epidermis isolated by LCM.

Table S3. Accession numbers, primer sequences and amplicon length of reference genes.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

Subcompartment localization of the side chain xyloglucan-synthesizing enzymes within Golgi stacks of tobacco suspension-cultured cells

Laurence Chevalier^{1,†}, Sophie Bernard[‡], Yasmina Ramdani, Romain Lamour, Muriel Bardor, Patrice Lerouge, Marie-Laure Follet-Gueye and Azeddine Driouich^{*}

Laboratoire 'Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale,' UPRES EA 4358, Institut Fédératif de Recherche Multidisciplinaire sur les Peptides 23, Plate-forme de Recherche en Imagerie Cellulaire de Haute Normandie (PRIMACEN), IBI SA, Université de Rouen, 76821 Mont-Saint Aignan Cedex, France

Received 24 July 2010; revised 10 September 2010; accepted 21 September 2010; published online 15 November 2010.

^{*}For correspondence (fax +33 235146615; e-mail azeddine.driouich@univ-rouen.fr).

[†]Present address: Groupe de Physique des Matériaux, UMR6634-CNRS, Institut des Matériaux Université de Rouen – Faculté des Sciences et Techniques BP 12 – Technopôle du Madrillet, Avenue de l'Université, 76801 St Etienne du Rouvray cedex.

[‡]These authors contributed equally to this work. This paper is dedicated to the memory of our colleague Pr. S. Barray.

SUMMARY

Xyloglucan is the dominant hemicellulosic polysaccharide of the primary cell wall of dicotyledonous plants that plays a key role in plant development. It is well established that xyloglucan is assembled within Golgi stacks and transported in Golgi-derived vesicles to the cell wall. It is also known that the biosynthesis of xyloglucan requires the action of glycosyltransferases including α -1,6-xylosyltransferase, β -1,2-galactosyltransferase and α -1,2-fucosyltransferase activities responsible for the addition of xylose, galactose and fucose residues to the side chains. There is, however, a lack of knowledge on how these enzymes are distributed within subcompartments of Golgi stacks. We have undertaken a study aiming at mapping these glycosyltransferases within Golgi stacks using immunogold-electron microscopy. To this end, we generated transgenic lines of tobacco (*Nicotiana tabacum*) BY-2 suspension-cultured cells expressing either the α -1,6-xylosyltransferase, AtXT1, the β -1,2-galactosyltransferase, AtMUR3, or the α -1,2-fucosyltransferase AtFUT1 of *Arabidopsis thaliana* fused to green-fluorescent protein (GFP). Localization of the fusion proteins within the endomembrane system was assessed using confocal microscopy. Additionally, tobacco cells were high pressure-frozen/freeze-substituted and subjected to quantitative immunogold labelling using anti-GFP antibodies to determine the localization patterns of the enzymes within subtypes of Golgi cisternae. The data demonstrate that: (i) all fusion proteins, AtXT1-GFP, AtMUR3-GFP and AtFUT1-GFP are specifically targeted to the Golgi apparatus; and (ii) AtXT1-GFP is mainly located in the *cis* and medial cisternae, AtMUR3-GFP is predominantly associated with medial cisternae and AtFUT1-GFP mostly detected over *trans* cisternae suggesting that initiation of xyloglucan side chains occurs in early Golgi compartments in tobacco cells.

Keywords: cell wall, cryofixation, green-fluorescent protein, Golgi, immunocytochemistry, xyloglucan.

INTRODUCTION

Plant growth and morphology are largely dependent on the biosynthesis of the cell wall. In dicotyledonous plants, the primary cell wall comprises cellulose microfibrils and a xyloglucan network embedded within a matrix of non-cellulosic polysaccharides and proteins (i.e. glycoproteins and proteoglycans). Four major types of non-cellulosic polysaccharides are found in the primary walls of plant cells (*in taxa* outside the gramineae), namely the neutral

hemicellulosic polysaccharide xyloglucan (XyG), and three main pectic polysaccharides, homogalacturonan (HG), rhamnogalacturonan I and II (RG-I and RG-II) (Cosgrove, 2005).

XyG consists of a β -D-(1 \rightarrow 4)-glucan backbone to which are attached side chains containing xylosyl, galactosyl-xylosyl or fucosyl-galactosyl-xylosyl residues. In dicotyledonous and non-grass monocotyledonous plants, XyG is

the principal polysaccharide that cross-links the cellulose microfibrils. It is able to bind cellulose tightly because its β -D-(1 \rightarrow 4)-glucan cellulose-like backbone can form numerous hydrogen bonds with the microfibrils, whereas the side chains give rise to regions where microfibril binding is interrupted. A single XyG molecule can therefore interconnect separated cellulose microfibrils. This XyG-cellulose network forms a major load-bearing structure that contributes to the structural integrity of the cell wall and the control of cell expansion during growth (Cosgrove, 2005).

XyG biosynthesis has long been an interesting area of investigation. It mainly requires, among others, a glucan synthase activity for backbone assembly and several glycosyltransferases involved in the addition of the side chains, including xylosyltransferase, galactosyltransferase and fucosyltransferase activities.

Early studies on pea stems have demonstrated that all the glycosyltransferases necessary for XyG biosynthesis are associated with Golgi membranes (Ali *et al.*, 1986; Camirand and MacLachlan, 1986; Camirand *et al.*, 1987). Hayashi and Matsuda (1981) and Hayashi *et al.* (1981) have shown that the β -glucan synthase produces the required β -1,4-glucan substrate molecule necessary for XyG xylosyltransferase activity. In addition, it has been demonstrated that XyG synthesis requires the cooperation of XyG β -1,4-glucan synthase and the XyG xylosyltransferase within Golgi membranes supporting the existence of a multienzyme complex responsible for XyG biosynthesis (Hayashi *et al.*, 1988).

Since then, considerable efforts have been devoted to the identification and characterization of the genes involved in XyG biosynthesis using functional genomics and the model plant *Arabidopsis thaliana* (see Lerouxel *et al.*, 2006). For example, the XyG fucosyltransferase AtFUT1 (CAZy GT37) was the first type-II glycosyltransferase characterized at the biochemical level (Perrin *et al.*, 1999). AtFUT1 has been identified as one member of a large family containing nine putative glycosyltransferases. However, further analyses of the enzymes have shown that three members of this family are not involved in the fucosylation of XyG (Sarria *et al.*, 2001). Later on, the identification and characterization of the *mur2* mutant of *Arabidopsis* provided compelling evidence that the AtFUT1 gene encodes the unique α -1,2-fucosyltransferase activity responsible for XyG fucosylation (Vanzin *et al.*, 2002). Similarly, one XyG β -1,2-galactosyltransferase (AtMUR3; CAZy GT47) activity was successfully characterized using both mutant analysis (*mur3*) and heterologous expression of the enzyme (Madson *et al.*, 2003). Nevertheless, as the galactose residue of the XyG molecule can be found in two different positions, it seems that at least one XyG galactosyltransferase remains to be identified. AtMUR3 acts specifically on the third xylose of the XXXG core structure of XyG. An important contribution to understand-

ing XyG biosynthesis was also made by the characterization of two α -1,6-xylosyltransferases activities required for XyG xylosylation (CAZy GT34). First, one xylosyltransferase activity (named AtXT1) was identified based on sequence homology with a previously identified α -1,6-galactosyltransferase from fenugreek (Edwards *et al.*, 1999), and characterized as a α -1,6-xylosyltransferase using heterologous expression in *Pichia pastoris* (Faik *et al.*, 2002). Cavalier and Keegstra (2006) extended this work by the characterization of a second xylosyltransferase activity (named AtXT2), encoded by a gene closely related to AtXT1. AtXT1 and AtXT2 preferentially add the first xylosyl residue to the fourth glucosyl residue at the reducing end of the acceptor XyG oligosaccharides. More recently, Zobotina *et al.* (2008) have identified another XyG-xylosyltransferase named XXT5 that has also been localized to Golgi bodies by using confocal microscopy.

Another enzyme involved in XyG biosynthesis is the glucan synthase. Recently, a gene from the Cellulose Synthase-Like C family (AtCSLC4; CAZy GT2) was shown to encode a Golgi localized β -1,4-glucan synthase activity providing a strong candidate for the, as yet, unidentified XyG β -glucan synthase (Cocuron *et al.*, 2007).

Another approach that has helped understanding XyG biosynthesis within Golgi stacks is immunocytochemistry using transmission electron microscopy and anti-XyG antibodies specific either for the backbone or for the fucosylated side chains. Based on this methodology, it was suggested that the assembly of XyG occurs exclusively in the late compartments of Golgi stacks namely *trans* cisternae, the *trans*-Golgi network (Zhang and Staehelin, 1992; Driouich *et al.*, 1993; Staehelin and Driouich, 1997). So far, such a Golgi compartmentalization of XyG-associated sugar epitopes has not been investigated for the glycosyltransferases involved in the biosynthesis of this hemicellulosic polysaccharide. Therefore and as a starting point towards understanding how all functional activities involved in XyG biosynthesis are organized within Golgi cisternae, we have investigated Golgi compartmentalization of three glycosyltransferases (namely AtXT1, AtMUR3 and AtFUT1) involved in the assembly of XyG side chains in transformed tobacco BY-2 cells expressing GFP-tagged AtXT1, AtMUR3 or AtFUT1. To this end, immunogold electron microscopy with anti-GFP antibodies along with quantitative analysis of antibody binding within Golgi cisternae based on relative labelling index calculations were used. Our findings show that fusion proteins, AtXT1-GFP, AtMUR3-GFP and AtFUT1-GFP were targeted to Golgi stacks of tobacco BY-2 suspension-cultured cells. In addition, labelling of AtXT1-GFP was mostly associated with *cis* and medial cisternae, and labelling of AtMUR3-GFP and AtFUT1-GFP was mainly detected in medial and *trans* cisternae of Golgi stacks respectively. These findings suggest that the assembly of XyG side chains involves all subtypes of Golgi cisternae.

RESULTS

Structural analysis of XyG isolated from tobacco BY-2 suspension-cultured cells

Prior to any expression or localization studies of XyG-synthesizing enzymes in BY-2 suspension-cultured cells, we performed a structural analysis of XyG isolated from the cell wall of these cells via the enzymatic oligosaccharide fingerprinting procedure as previously described (Lerouxel *et al.*, 2002; Ray *et al.*, 2004). The population of xyloglucan oligosaccharides generated by endoglucanase treatment of BY-2 cell walls was analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry. As described in suspension-cultured cells of *Nicotiana plumbaginifolia* (Sims *et al.*, 1996), the main ions were assigned to (M + Na)⁺ adducts of XXGG-type XyG fragments partially acetylated and substituted with arabinosyl residues (S) (Figure 1). In addition, minor non-fucosylated XXXG-type oligosaccharides were detected, including an acetylated monogalactosylated XXLG or XLXG fragment.

Subcellular localization of XyG-glycosyltransferases fused to green fluorescent protein

To establish the subcellular localization of XyG-glycosyltransferases, AtXT1, AtMUR3 and AtFUT1 in tobacco leaf epidermal cells using confocal microscopy, we created fluorescent protein fusions of these enzymes (see Materials and methods). All three glycosyltransferases are type II membrane-bound proteins containing a transmembrane domain and supposed to be localized in the Golgi apparatus.

As illustrated in Figure 2, transformed tobacco epidermal cells with AtXT1-GFP (Figure 2a), AtMUR3-GFP (Figure 2d)

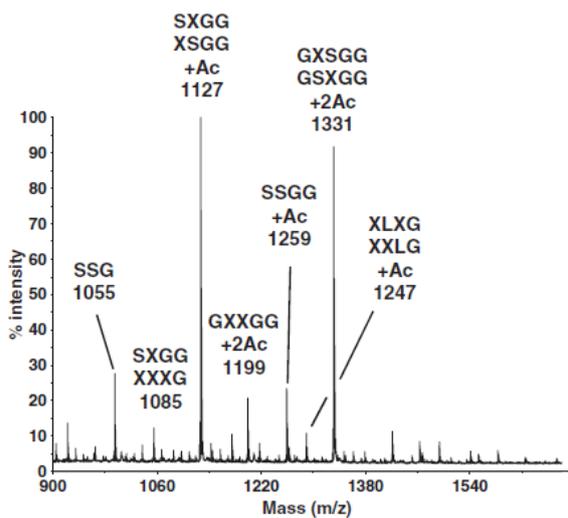


Figure 1. MALDI-TOF mass spectrum of xyloglucan fragments released by endoglucanase treatment of XyG extracted from tobacco BY-2 suspension-cultured cells. XXGG, XSG, SXG, SSGG, XXLG, XLXG refer to XXGG-type or XXXG-type fragments according to Fry *et al.* (1993).

The Plant Journal © 2010 Blackwell Publishing Ltd, *The Plant Journal*, (2010), 64, 977–989
No claim to original US government works

or AtFUT1-GFP (Figure 2g) displayed a punctate pattern of GFP fluorescence, as would be expected from the dispersed organization of Golgi stacks in plant cells (Nebenführ *et al.*, 1999; Pagny *et al.*, 2003). To confirm Golgi localization, we co-expressed each glycosyltransferase-GFP with the well known fluorescent Golgi marker, α 2,6-sialyltransferase (ST) fused to YFP, in the same epidermal leaf cells. As shown in Figure 2(c, f, i), AtXT1-GFP, AtMUR3-GFP and AtFUT1-GFP fluorescence signals co-localized with ST-YFP fluorescence to punctate and mobile structures typical of Golgi bodies.

To investigate the localization of the glycosyltransferases in the Golgi bodies using transmission electron microscopy, we could not use transiently transformed epidermal cells, mostly because the transformation yield was very low. We therefore generated stably transformed tobacco-suspension-cultured BY-2 cells expressing AtXT1-GFP, AtMUR3-GFP or AtFUT1-GFP at a high level (up to 90% of the cells expressed GFP). Then, we also studied the subcellular localization of the three fusion proteins in the stably transformed suspension cultured BY-2 cells using confocal imaging. In all cases and as for transiently expressed cells, we observed fluorescent and mobile spots (of 1 μ m in size) consistent with Golgi localization for AtXT1-GFP, AtMUR3-GFP and AtFUT1-GFP (Figure 2j, k, l). None of the transient or stably transformed cells showed any additional fluorescence in any other organelles of the endomembrane system. These data demonstrate that AtXT1-GFP, AtMUR3-GFP and AtFUT1-GFP of arabidopsis have Golgi localization in tobacco leaf epidermal and suspension-cultured cells.

Ultrastructural organization of Golgi stacks in high pressure frozen/freeze substituted tobacco BY-2 cells

We first examined the quality of ultrastructural preservation of BY-2 suspension-cultured cells prepared by high pressure freezing and freeze-substitution in acetone containing 0.5% uranyl acetate (but no osmium), and embedded in London Resin White (LRW) for immunocytochemistry. As shown in Figure 3(a), BY-2 cells exhibited very well preserved subcellular structures including the nucleus, nuclear membrane, mitochondria, vacuole, endoplasmic reticulum, secretory vesicles and Golgi stacks. In the context of this paper, Golgi stacks were clearly distinguishable and their organization was typical of plant suspension-cultured cells (Zhang and Staehelin, 1992; Andreeva *et al.*, 1998; Winiur *et al.*, 1998). Also and as illustrated in Figure 3(b,c), were consistently discernable based on their very well characterized ultrastructure as previously described (Staehelin *et al.*, 1990; Zhang and Staehelin, 1992; Driouch *et al.*, 1993). *Cis* cisternae exhibited the most irregular contour, were faintly stained and had the widest lumen. Medial cisternae had a narrower lumen, were more elongated and picked up more stain than *cis* cisternae. There is often a gradation of luminal staining of the medial cisternae in a *cis*-to-*trans* direction. *Trans* cisternae presented a very thin, collapsed lumen that

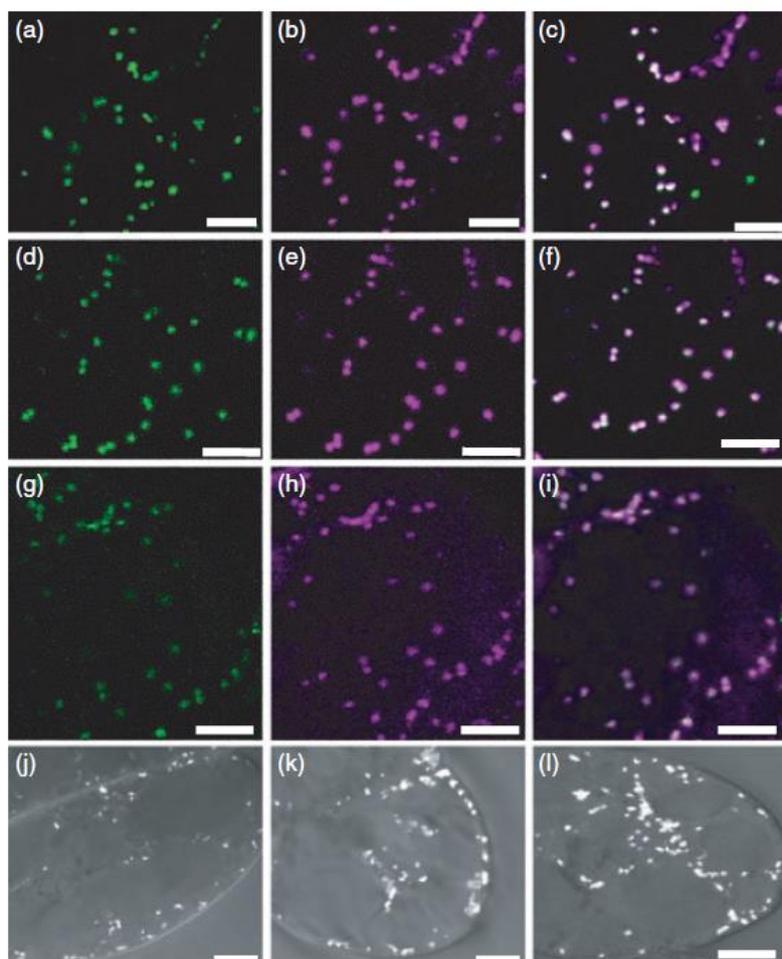


Figure 2. Distribution of AtXT1-GFP, AtMUR3-GFP and AtFUT1-GFP in living tobacco cells. Images of epidermal leaf cells (a–i). Images of suspension-cultured cells (j–l). Brightly fluorescent spots typical of Golgi localization are seen following transient expression of AtXT1-GFP (a), AtMUR3-GFP (d) and AtFUT1-GFP (g) in leaf epidermal cells. Localization of the Golgi marker, α 2,6-sialyltransferase (ST), fused to YFP in epidermal leaf cells (b, e, h). Golgi stacks are visible as bright spots. Co-localization of AtXT1-GFP (c), AtMUR3-GFP (f) or AtFUT1-GFP (i) with ST-YFP in epidermal leaf cells confirming Golgi localization of the XyG-glycosyltransferases. Stable expression of AtXT1-GFP (j), AtMUR3-GFP (k) and AtFUT1-GFP (l) in tobacco BY-2 cultured cells also shows fluorescent spots typical of Golgi localization. Scale bars 8 μ m.

is always densely stained even more than medial cisternae. The *trans*-Golgi network was observed as a branched tubulovesicular structure that is frequently, but not systematically, located close to *trans* cisternae consistent with previous findings (Zhang and Staehelin, 1992).

Immunolocalization of XyG epitopes in tobacco cells

Prior to any investigation of XyG-synthesizing enzymes at the electron microscopical level, we immunolocalized XyG epitopes in tobacco BY-2 suspension-cultured cells using confocal imaging and immunogold electron microscopy with the mAb CCRC-M86 (kindly provided by Prof. M. Hahn; University of Georgia, USA), which recognizes non-fucosylated xyloglucan (Pattathil *et al.*, 2010). On immunodot assay, the CCRC-M86 antibody reacted strongly with native tamarind XyG but not with a hydrolyzed sample of the polymer (Figure S1 in Supporting Information). It also reacted with XyG isolated from tobacco suspension-cultured cells.

Confocal imaging of immunostained cells with the mAb CCRC-M86 showed a punctate fluorescence in the cytosol

and a quite uniform staining at the cell surface (Figure 4a,b). This is consistent with the CCRC-M86-recognized XyG-associated epitopes being located in Golgi stacks and cell wall, two compartments where XyG is known to occur.

Immunogold labelling of cryo-fixed BY-2 cultured cells showed XyG epitopes over Golgi stacks and in the cell wall (Figure 4c,d). Gold particles were mainly found over medial and *trans* cisternae, the *trans*-Golgi network and Golgi-derived transport vesicles. Also, labelling of the cell wall was mostly associated with the closest zone to the plasma membrane (Figure 4d). In contrast, no labelling was found in BY-2 cells using the mAb CCRC-M1 (data not shown) specific for an α -L-Fucp-(1-2)- β -D-Galp epitope of XyG, consistent with the previously published data showing that tobacco XyG does not contain fucosyl residues (Hoffman *et al.*, 2005).

Immunogold localization of the glycosyltransferases-GFP within Golgi cisternae

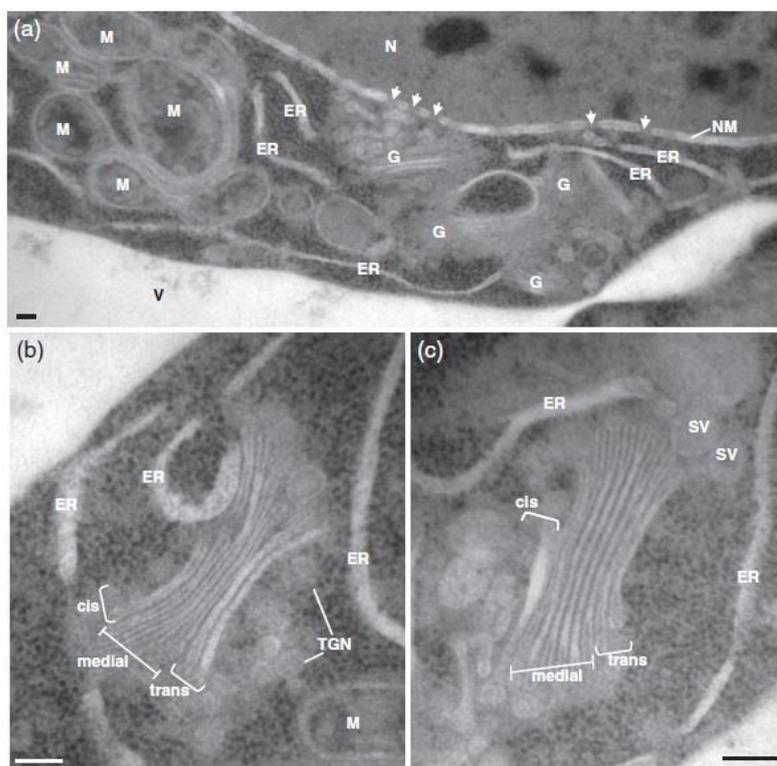
Once we confirmed Golgi localization of XyG epitopes and glycosyltransferases using confocal microscopy (see

Figure 3. Ultrastructural organization of BY-2 Golgi stacks.

Electron micrographs of tobacco BY2-suspension-cultured cells preserved by high pressure freezing.

(a) A view of the cytoplasm showing different organelles including Golgi stacks, endoplasmic reticulum, vacuole, mitochondria and nucleus. White arrowheads indicate nuclear pores.

(b, c) Images of Golgi stacks exhibiting different subtypes of cisternae including *cis*, medial and *trans*. Note that the *trans*-Golgi network is not always associated with all Golgi stacks. ER, endoplasmic reticulum; G, Golgi stack; NM, nuclear membrane; N, nucleus; M, mitochondria; SV, secretory vesicles; TGN, *trans*-Golgi network; V, vacuole. Scale bars: 100 nm.



above), we investigated distribution of the enzymes within Golgi cisternae using immunogold-electron microscopy. Labelling of AtXT1-GFP, AtMUR3-GFP and AtFUT1-GFP was performed by employing anti-GFP antibodies in stably transformed BY-2 cells prepared by HPF/FS technique.

Immunogold labelling was quantified over each Golgi cisterna (fifty Golgi stacks with distinguishable cisternal subtypes) and subjected to chi-squared (χ^2) test to check for labelling specificity in transformed BY-2 cells versus wild type. The relative labelling index (RLI) was also determined to evaluate specific gold particles distribution within different subtypes of Golgi cisternae (Mayhew *et al.*, 2002) (see Materials and methods).

Golgi distribution of AtXT1-GFP

Immunogold labelling of Golgi stacks of AtXT1-GFP transgenic BY-2 cultured cells with anti-GFP antibodies is illustrated in Figure 5(a,b). Gold particles were mainly localized over *cis*- and medial-Golgi cisternae and also in transport vesicles associated with Golgi margins.

Quantification of labelling and chi-square test were performed (Table 1a) to confirm the specificity of the signal in cells expressing AtXT1-GFP BY-2 versus wild type cells. The total chi-squared value (31.28) was found to be superior to that of the contingency table, $\chi^2_{table} = 12.38$ (with a degree of

freedom of 3 and an uncertainty degree $\alpha = 0.005$) indicating that labelling is specific in Golgi stacks. In addition, distribution of GFP-tagged AtXT1 within subtypes of Golgi cisternae in transformed cells was assigned based on RLI determination. The RLI values for *cis* and medial cisternae were found to be superior to 1 (1.66 for *cis* cisternae and 1.27 for medial cisternae; see Table 1b), indicating a specific and preferential labelling of these two Golgi compartments with anti-GFP antibodies.

Golgi distribution of AtMUR3-GFP

Localization of AtMUR3 was performed using the same procedure. Immunogold labelling of Golgi stacks of AtMUR3-GFP transgenic BY-2 cultured cells with anti-GFP antibodies is shown in Figure 6(a,b). Gold particles were also mainly localised in Golgi stacks and seemed to be preferentially in the medial-Golgi cisternae. Quantification of labelling and chi-square tests were performed as for cells expressing AtXT1-GFP (see above). The total chi-squared value (25.69), was found to be greater than that of the contingency table, $\chi^2_{table} = 12.38$ (with a degree of freedom of 3 and an uncertainty degree $\alpha = 0.005$) indicating that labelling in Golgi stacks is specific (Table 2a). In addition, analysis of AtMUR3-GFP distribution based on RLI determination indicates a preferential labelling of medial cisternae (RLI value 1.67 for medial cisternae; see Table 2b).

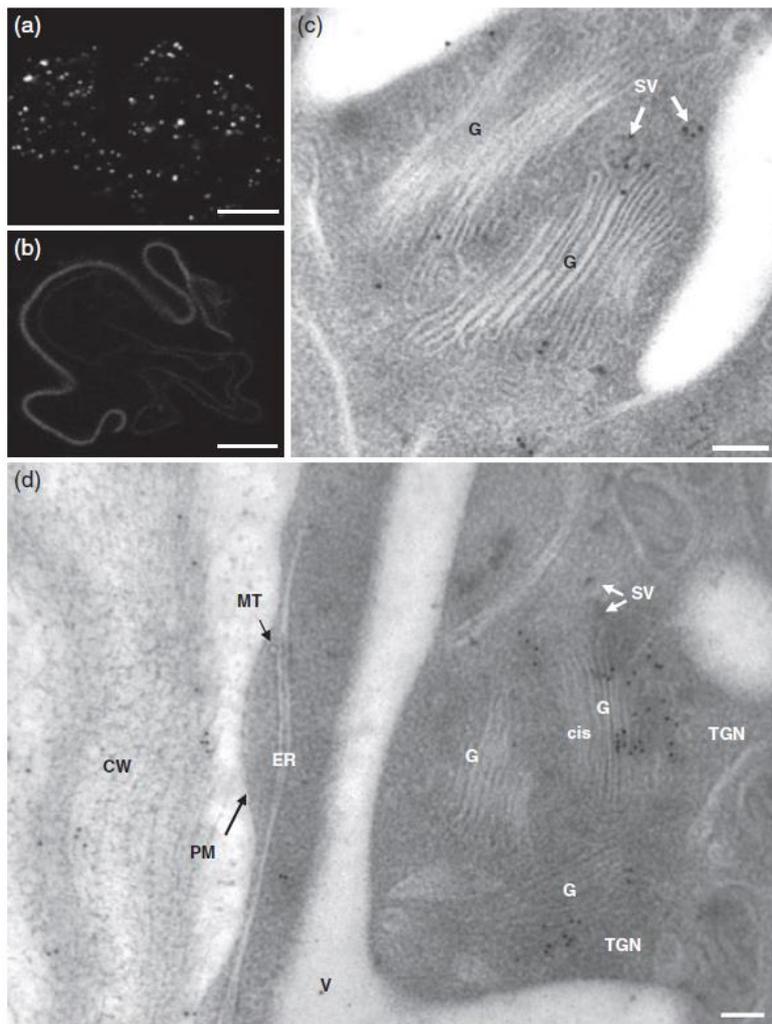


Figure 4. Immunocytochemical localization of XyG epitopes in tobacco BY-2 suspension-cultured cells with the mAb CCRC-M86.

(a, b) Confocal microscope images showing fluorescent staining of Golgi bodies (a) and the cell surface (b). CCRC-M86 epitopes localize to both Golgi stacks and the forming cell wall of tobacco protoplasts.

(c, d) Electron micrographs of HPF/FS cells illustrating immunogold labelling of Golgi stacks and the cell wall. Note that labelling is found over Golgi cisternae Golgi-derived secretory vesicles (c, d) and the TGN (d). CW, Cell wall; ER, endoplasmic reticulum; G, Golgi stack; MT, microtubule; PM, plasma membrane; SV, secretory vesicles; TGN, *trans*-Golgi network; V, vacuole. Scale bars 8 μ m (a, b), 100 nm (c, d).

Golgi distribution of AtFUT1-GFP

Quantification of immunogold labelling, of Golgi stacks in transgenic BY-2 cultured cells expressing AtFUT1-GFP, and a chi-squared test were performed as for AtXT1-GFP and AtMUR3-GFP. The total chi-squared value (22.41), was found to be superior compared with that of the contingency table, $\chi^2_{table} = 12.38$ (with a degree of freedom of 3 and an uncertainty degree $\alpha = 0.005$) indicating that labelling in Golgi stacks is specific (Table S1 in Supporting Information). The RLI values were found to be 1.00 for *cis* cisternae, 0.84 for medial cisternae, 1.61 for *trans* cisternae and 0.97 for the TGN. The data indicate a preferential labelling of *trans*-Golgi cisternae as the RLI is superior to 1.

Together the immunogold labelling data coupled to quantitative and statistical analysis of the binding pattern of GFP indicate that in tobacco BY-2 suspension-cultured cells, the AtXT1 is mostly located in *cis* and medial cisternae,

whereas AtMUR3 and AtFUT1 are predominantly associated with medial- and *trans*-Golgi cisternae, respectively.

DISCUSSION

The goal of the present study was to gain insights onto the spatial organization of the biosynthesis of the complex polysaccharide XyG within Golgi stacks of higher plants. Therefore, we mapped three glycosyltransferases, namely AtXT1, AtMUR3 and AtFUT1 that are involved in the biosynthesis of the side chains of XyG within different subtypes of Golgi cisternae of tobacco BY-2 cells. As no antibodies directed against these enzymes are currently available, we have chosen to investigate their localization indirectly by using anti-GFP antibodies in transgenic tobacco cells expressing the glycosyltransferases fused to GFP. We have previously used such a strategy to localize various glycosyltransferases involved in the assembly of *N*-linked glycoproteins (see Follet-Gueye *et al.*, 2003; Pagny *et al.*, 2003;

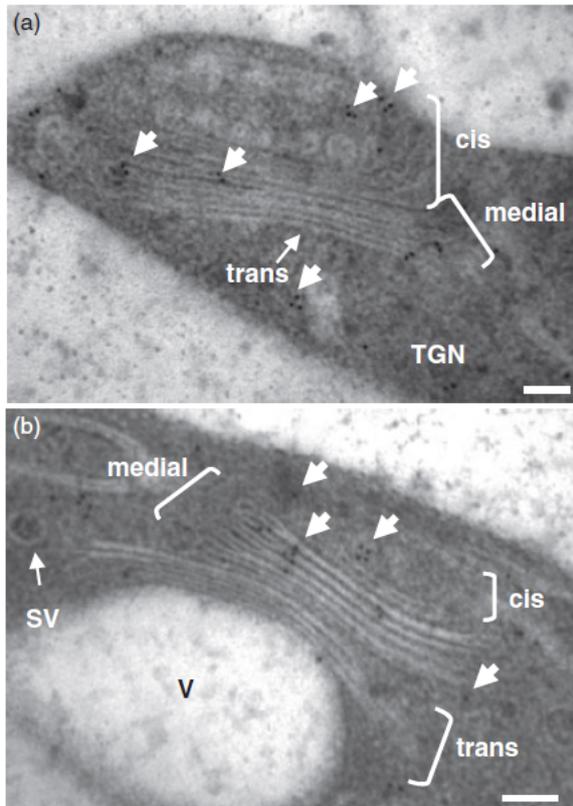


Figure 5. Immunogold localization of the AtXT1-GFP fusion protein in Golgi stacks of transformed tobacco BY-2 suspension-cultured cells with anti-GFP antibodies.

(a, b) Two electron micrographs illustrating immunolocalization of AtXT1-GFP fusion protein within Golgi stacks (see also Table 1 for quantification of labelling).

SV, secretory vesicles; TGN, *trans*-Golgi network; V, vacuole. Scale bars 100 nm.

Saint-Jore-Dupas *et al.*, 2006) within specific compartments of tobacco Golgi stacks. We show in the present study that the three enzymes are associated with all compartments of Golgi stacks with AtXT1, mainly found over *cis* and medial cisternae, AtMUR3 being mostly associated with medial cisternae and AtFUT1 in *trans* cisternae. These findings suggest that all Golgi cisternae are involved in XyG assembly by the Golgi apparatus of plant cells.

XyG is known to be synthesized in the Golgi lumen before its delivery via Golgi-derived vesicles to the cell wall (Ray, 1980; Camirand *et al.*, 1987; Moore and Staehelin, 1988; Driouich *et al.*, 1993). The biosynthesis of this polysaccharide, predictably, requires the activities of a β -glucan synthase; one or possibly more α -xylosyltransferases; at least two β -galactosyltransferases; and an α -fucosyltransferase (Lerouxel *et al.*, 2006); as well as additional enzymes, such as nucleotide sugar transporters and nucleotide sugar interconversion enzymes (Seifert *et al.*, 2004; Nguema-Ona *et al.*, 2006).

In the past, only the products of XyG-synthesizing enzymes, carrying specific sugar epitopes, have been mapped within Golgi cisternae using anti-sugar antibodies and immunogold electron microscopy (Zhang and Staehelin, 1992). Quantitative immunolabelling experiments using antibodies recognizing either the XyG backbone (anti-XG antibodies: Lynch and Staehelin, 1992; Moore *et al.*, 1986) or an α -L-Fucp-(1 \rightarrow 2)- β -D-Galp epitope of XyG side chains in sycamore cultured cells have shown that the epitopes localize to *trans* cisternae and the TGN (Zhang and Staehelin, 1992). Based on these observations, the authors proposed that the biosynthesis of XyG is exclusively confined to *trans* cisternae and the TGN with the addition the β -1,4-linked glucosyl backbone being confined to *trans* cisternae and the fucosylation of the side chains associated partly with the *trans* cisternae and partly with the TGN. The authors also suggested that no XyG precursors are formed in *cis* or medial cisternae. Nevertheless, it could be argued that the sugar epitopes recognized by both antibodies used in that study are not accessible (and thus not detectable) until they reach the *trans* and the TGN compartments, or that the antibodies do not bind XyG precursor forms in *cis* and medial cisternae. In contrast to the study of Zhang and Staehelin (1992), the study of Brummell *et al.* (1990) on XyG-glycosyltransferase distribution in pea using biochemical assays of enzyme activities on separated Golgi membranes suggested that all Golgi cisternae are involved in XyG biosynthesis. These authors postulated that the glucose-xylose backbone of XyG is initiated in *cis* cisternae, continued in medial cisternae and completed in *trans*, where the fucosylation of the side chains is also initiated.

We first demonstrated that the GFP-tagged enzymes (AtXT1, AtMUR3 and AtFUT1) were targeted to Golgi stacks in tobacco cells as revealed by confocal imaging of transgenic plants. All the enzymes are predicted to be localized in the Golgi apparatus. We considered both C- and N-terminal fusions and we found that C-terminal fusions had no impact on subcellular localization of the enzymes. A similar observation (Golgi localization) was made when the *MUR3* gene was tagged with RFP at C-terminal position in Arabidopsis plants (Tamura *et al.*, 2005). In contrast, we found N-terminal fusion of GFP to MUR3 led to a dual localization, Golgi and cytosol (not shown). Tagging proteins with GFP at the C-terminal is generally known to preserve the localization of the native protein better than tagging at N-terminal position (Palmer and Freeman, 2004).

Zhang and Staehelin (1992) have suggested that only *trans* cisternae and TGN are involved in XyG biosynthesis in sycamore cells. In contrast our immunogold labelling data presented herein do favor the participation of all Golgi cisternae in XyG assembly. The fact that AtXT1 and AtMUR3 are detected in *cis* and medial cisternae of Golgi stacks implies the involvement of these early compartments in the biosynthesis of XyG. This is assuming that the enzymes are

Table 1 Quantitative analysis of anti-GFP labelling over Golgi stacks in tobacco BY-2 cells expressing AtXT1-GFP. (a) Comparison of gold particles distribution in Golgi cisternae of wild type and transformed cells (expressing AtXT1-GFP) of BY-2 cultured cells. (b) Observed and expected distribution of gold particles in subtypes of Golgi cisternae of tobacco BY-2 cells expressing AtXT1-GFP and relative labelling index values

Compartment	Wild type cells			Transformed cells			Total observed gold particles
	Observed gold particles	Expected gold particles	χ^2 values	Observed gold particles	Expected gold particles	χ^2 values	
(a)							
<i>Cis</i>	18	29.26	4.33	124	112.74	1.12	142
<i>Medial</i>	33	43.89	2.70	180	169.11	0.70	213
<i>Trans</i>	32	19.37	8.24	62	74.63	2.14	94
<i>TGN</i>	19	9.48	9.56	27	36.52	2.48	46
Column totals	102	102	24.83	393	393	6.44	495
Compartment	Observed gold particles, n_o	Observed points, P	Expected gold particles, n_e	Relative labelling index n_o/n_e			
(b)							
<i>Cis</i>	106	898	64.04	1.66 ^a			
<i>Medial</i>	156	1719	122.58	1.27 ^a			
<i>Trans</i>	41	952	67.89	0.60			
<i>TGN</i>	2	708	50.49	0.04			
Column totals	305	4277	305				

Quantification of labelling was done on 68 Golgi stacks for each line. The total chi-squared value (24.83 + 6.44) compared with that of contingency table analysis, with a degree of freedom of 3, confirms specificity of gold particles distribution between wild-type and transformed cells.

^aIdentify Golgi compartments that are preferentially labelled.

Table 2 Quantitative analysis of anti-GFP labelling over Golgi stacks in tobacco BY-2 cells expressing AtMUR3-GFP. (a) Comparison of gold particles distribution in Golgi cisternae of wild type and transformed cells (expressing AtMUR3-GFP) of tobacco BY-2 cultured cells. (b) Observed and expected distribution of gold particles in subtypes of Golgi cisternae of tobacco BY-2 cells expressing AtMUR3-GFP and relative labelling index values

Compartment	Wild type cells			Transformed cells			Total observed gold particles
	Observed gold particles	Expected gold particles	χ^2 values	Observed gold particles	Expected gold particles	χ^2 values	
(a)							
<i>Cis</i>	15	13.49	0.17	48	49.51	0.05	63
<i>Medial</i>	26	34.89	2.27	137	128.11	0.62	163
<i>Trans</i>	5	10.49	2.87	44	38.51	0.78	49
<i>TGN</i>	24	11.13	14.9	28	40.87	4.05	52
Column totals	70	70	20.19	257	257	5.50	327
Compartment	Observed gold particles, n_o	Observed points, P	Expected gold particles, n_e	Relative labelling index n_o/n_e			
(b)							
<i>Cis</i>	33	595	35.62	0.93			
<i>Medial</i>	116	1159	69.38	1.67 ^a			
<i>Trans</i>	27	613	36.69	0.74			
<i>TGN</i>	4	640	38.31	0.10			
Column totals	180	3007	180				

Quantification of labelling was done on 57 Golgi stacks for each line. The total chi-squared value (20.19 + 5.50) compared with that of contingency table analysis, with a degree of freedom of 3, confirms specificity of gold particles distribution between wild-type and transformed cells.

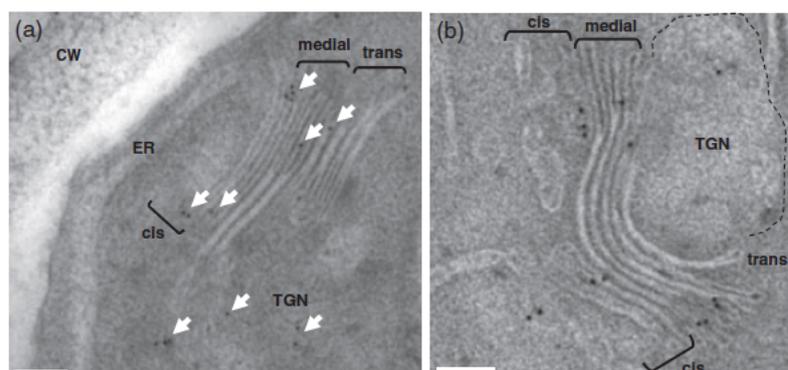
^aIdentify Golgi compartments that are preferentially labeled.

functional within these compartments. Thus, our results are in favor of the model described by Brummell *et al.* (1990), which involves all Golgi cisternae in XyG biosynthesis. Our

data, however, do not necessarily contradict the model proposed by Zhang and Staehelin (1992) because the absence of XyG backbone labelling in *cis* and medial

Figure 6. Immunogold localization of the AtMUR3-GFP fusion protein in Golgi stacks of transformed tobacco BY-2 suspension-cultured cells with anti-GFP antibodies.

(a, b) Two electron micrographs illustrating immunogold localization of AtMUR3-GFP fusion protein within Golgi stacks (see also Table 2 for quantification of labelling). CW, Cell wall; ER, endoplasmic reticulum; TGN, *trans*-Golgi network. Scale bars 100 nm.



cisternae observed in that study could only be due to inaccessibility (or masking) of sugar epitopes recognized by anti-XG antibodies. The possible explanation is that, in sycamore cells, the backbone of XyG could be initiated in *cis* and medial cisternae by the action of the corresponding enzymes but that the sugar epitopes (products of the enzymes) would not be detectable until they reach the *trans* cisternae and the TGN.

Early studies on the biosynthesis of XyG *in vitro* have clearly shown that the incorporation of glucose and xylose into this polymer occurs by cooperative addition (Ray, 1980; Hayashi and Matsuda, 1981). Thus, it is possible that the AtXT1 and the glucan synthase, responsible for the biosynthesis of the backbone, enzymes co-exist as a multi-protein complex to efficiently initiate the synthesis of XyG within Golgi stacks of tobacco cells. Although localization of the glucan synthase responsible for the generation of the backbone remains to be established, it is likely that this enzyme co-localizes with the xylosyltransferase (XT1) in the same Golgi cisternae (i.e. *cis* and medial compartments). Such a hypothesis will await further studies on Golgi localization of the XyG-glucan synthase.

Also, unlike the addition of glucose and xylose, it has been shown that the incorporation of galactose is independent of that of fucose and that the galactosylation precedes fucosylation of XyG (Camirand and MacLachlan, 1986; Farkas and MacLachlan, 1988). Therefore, fucosylation may begin at least in the compartment where galactosylation occurs (AtMUR3 is mostly found over medial cisternae in this study) but might also start only in later compartments, *trans* cisternae and the TGN, as suggested previously in both studies of Zhang and Staehelin (1992) and Brummell *et al.* (1990). The preferential localization of AtFUT1 to *trans* cisternae (Table S1) in our tobacco system is consistent with this hypothesis. Nevertheless, fucosylated XyG does not occur in wild-type tobacco BY-2 cells.

To summarize, the present study is an examination of immunogold electron microscopy-based distribution of XyG-synthesizing enzymes within Golgi stacks of higher plants. Our findings do show that the enzymes involved in the

biosynthesis of XyG side chains are distributed all over Golgi stacks with some maxima occurring in given Golgi compartments. Thus, the majority of xylosylation, galactosylation and fucosylation of XyG is likely to occur sequentially in *cis*, medial and *trans* compartments of Golgi stacks in plants.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and growth conditions

Suspension cells of *Nicotiana tabacum* cv. *Bright Yellow 2* (BY-2) were cultured in the Murashige and Skoog liquid medium (Sigma M5524, <http://www.sigmaaldrich.com>): 4.3 g L⁻¹ in sucrose 30 g L⁻¹, KH₂PO₄ 100 mg L⁻¹, myo-inositol 51 mg L⁻¹, thiamine 1 mg L⁻¹, 2,4 dichlorophenoxyacetic acid 0.22 mg L⁻¹, pH 5.6, in dark, at 22°C, 140 rpm. Cells were subcultured every week by transferring 10 ml of suspension cells in 150 ml of fresh medium.

Nicotiana tabacum plants were grown in soil in a growth chamber under a 16 h photoperiod condition, 22–24°C and 60% relative humidity. Seven- to 8-week-old plants were used for the subcellular localization studies.

Cell wall extraction and purification

BY-2 suspension cells (15 g fresh weight) were filtered and crushed in liquid nitrogen, then heated at 70°C for 30 min in 25 ml of 96% ethanol, before being centrifuged at 5500 *g* for 15 min. The pellet was solubilized in 25 ml 96% ethanol and homogenized in a potter (Tenbroeck), before heating again at 70°C for 15 min and centrifugation at 5000 rpm for 10 min. The pellet, called cell wall residue (CWR), was freeze-dried. To remove lipids, the CWR was mixed with chloroform/methanol (1:1 v/v) for 24 h, filtered, washed with acetone and dried at 45°C (see Nguema-Ona *et al.*, 2006).

Xyloglucan extraction

The alkali-soluble hemicellulosic fraction was extracted from the CWR as previously described by Nguema-Ona *et al.*, 2006. Briefly, CWR was treated sequentially with 0.1% CDTA (*trans*-1,2-diaminocyclohexane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid) and 4 M KOH containing 1% (w/v) NaBH₄. The 4 M KOH hemicellulosic extract was neutralized with 10% (v/v) of acetic acid, dialyzed and finally freeze-dried.

MALDI-TOF mass spectrometry (MS) analysis

XyG fragments were generated by treating 2 mg of cell wall extract with 5 units of endo (1 → 4)-β-D-glucanase (EC 3.2.1.4, Megazyme International, <http://www.megazyme.com>) in 500 μl of 10 mM

ammonium acetate buffer, pH 5, overnight at 37°C. Glucanase-resistant material was removed by centrifugation after addition of EtOH to reach a final concentration of 80%. The EtOH soluble XyG oligosaccharides were evaporated and concentrated under a stream of air. MALDI-TOF MS of the XyG oligosaccharides generated by endoglucanase was recorded on a Voyager DE-Pro MALDI-TOF mass spectrometer (Applied Biosystems, <http://www.appliedbiosystems.com>) equipped with a nitrogen laser operating at 337 nm. Mass spectra were performed in the reflector delayed extraction mode using 2,5-dihydroxybenzoic acid (Sigma-Aldrich, <http://www.sigmaaldrich.com>) as matrix. The matrix, freshly dissolved at 5 mg ml⁻¹ in a 70:30 acetonitrile/0.1% TFA, was mixed with the water solubilized oligosaccharides in a ratio 1:1 (v/v). These spectra were recorded in a positive mode, using an acceleration voltage of 20 000 V with a delay time of 100 ns and above 50% of the laser energy. One thousand shots were accumulated for one spectrum and the data presented here are the sum of 5 acquired spectrum. The spectra were externally calibrated using commercially available peptides mixture from Applied Biosystems (Sequazyme™ Peptide Mass Standard kit).

Cloning procedure

The coding sequence of AtXT1, AtMUR3 and AtFUT1, were amplified by PCR without the stop codon using respectively. Forward *Bam*H1 (5'-CGCGGATCCCGATGATAGAGAAGTGTATAGGA-3') and Reverse *Nhe*I (5'-CTAGCTAGCCGTCGTCGCTACTAAGCTT-3') primers for AtXT1; Forward *Kpn*I (5'-GGGTACCCATGTTTCAAGGGTTTCT-3') and Reverse *Nhe*I (5'-CTAGCTAGCCGTGTCCTATCTCTG-3') primers for MUR3; Forward *Bam*H1 (5'-CGCGGATCCCGATGATAGAGAAGTGTATAGGA-3') and Reverse *Spe*I (5'-GGACTAGTTACTAGCTTAAGTCCCAGCT-3') primers for AtFUT1. The SALK cDNA clones were used as template (respectively U14458, S81470 and U24263).

Then, the amplified cDNA were introduced into the pBLT1221 (Pagny *et al.*, 2000) binary vector containing the sGFP, allowing a fusion of the protein to the Nter part of the sGFP, and each resulting construct was verified by sequencing. Finally, each cassette containing the chimeric protein was introduced into pBLT1121 binary vector to allow plant transformation.

Stable and transient expression in *Nicotiana tabacum*

The generated plasmids were transferred into *Agrobacterium tumefaciens* (strain GV3101 pMP90) by heat shock, and transformed agrobacterium were selected on YEB medium (beef extract 5 g L⁻¹, yeast extract 1 g L⁻¹, sucrose 5 g L⁻¹, MgSO₄·7H₂O 0.5 g L⁻¹) containing kanamycin (100 mg L⁻¹). Transformation of *N. tabacum* (cv BY-2) cells was performed as described by Gomord *et al.* (1998). Transformed cells were selected on the Murashige and Skoog medium (see above) containing kanamycin (100 mg L⁻¹) and cefotaxime (250 mg L⁻¹) and only micro-calli expressing GFP, screened for their fluorescence by confocal microscopy, were used to initiate suspension cultures.

Transformation of leaves of *N. tabacum* was obtained as follows: the agrobacteria were cultured for 20 h at 28°C in YEB media and then centrifuged at 3700 g to concentrate them. The excess medium was eliminated and the initial density of OD₆₀₀ was measured. Then, each construct was resuspended in an infiltration medium (MES 10 mM, MgCl₂ 10 mM, Acetosyringone 100 µM) to obtain a final density of OD₆₀₀ = 0.1 for Sialyltransferase::YFP (ST-YFP represents the first 52 amino acid of a rat α-2,6-sialyltransferase). AtXT1-GFP, AtMUR3-GFP and AtFUT1-GFP fusion proteins were tested with a final density of OD₆₀₀ = 0.1–0.8. Finally, ST-YFP and the AtXT1-GFP, AtMUR3-GFP and AtFUT1-GFP were incubated together for 1 h at room

temperature before the co-infiltration in leaves. Microscopic observation of leaf epidermal cells was made 2 days after infiltration.

Localization of fusion proteins in *N. tabacum*

Subcellular localization of fusion proteins were examined using a Leica TCS SP2 AOBS confocal laser scanning microscope. GFP fluorescence of epidermal cells and suspension cultured cells were imaged using an excitation wavelength of 488 nm with the emission wavelength at 500–520 nm. For colocalization of sGFP and YFP-venus in epidermal cells, a 488 and 514 nm argon ion laser were used simultaneously. Fluorescence signals were separated using an acoustic-optical beam splitter; emission signal was 495–510 nm for sGFP and 540–580 nm for YFP-venus. The power of each laser, gain and offset were identical for each experiment to compare images. Appropriate controls were performed to exclude the possibility of crosstalk between the two fluorochromes before image acquisition.

Dot blot

Five microliters containing 10 µg of purified xyloglucan from tamarind seeds, or 5–50 µg of tobacco BY-2 cell wall are deposited on PVDF membrane. The membrane saturation was done overnight in PBS buffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 100 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄ pH 7.5) + half milk 5%. The mAbs CCRC-M86 (kindly provided by Dr M. Hahn, Complex Carbohydrate Research Center, University of Georgia, USA) and CCRC-M1 were diluted 1/10 in PBS + 5% dry milk, and the membrane was incubated at room temperature for 2 h. The mAb CCRC-M1 was used as a negative control, as it recognizes fucosylated xyloglucan. After washing in PBS + milk (3 × 10 min), the membrane was incubated 2 h in a secondary antibody 1/500 (Anti mouse polyvalent Ig Alkaline phosphatase conjugate – Sigma). The membrane was washed again 2 × 10 min in PBS + milk and 2 × 10 min in PBS, before signal detection using the 'BCIP/NBT color development substrate' from Promega (<http://www.promega.com>).

Localization of xyloglucan epitopes in tobacco BY-2 cells

Immunolocalization of XyG epitopes using the mAb CCRC-M86 at the confocal microscopy level was done on protoplasts.

Protoplast preparation. Four-day-old BY-2 cells (400 µl) were plasmolyzed in 800 µl plasmolysis medium (20 mM MES buffer pH 5.6; 0.6 M mannitol; 0.5 mM CaCl₂; 0.25 mM MgCl₂) for 15–20 min. Then the cell wall was digested overnight at 25°C by incubation in 1 ml enzymatic mixture of 1% cellulase (Sigma) and 1% pectinase (Sigma) diluted in plasmolysis medium containing 0.1% bovine serum albumin (BSA). After three washes with plasmolysis medium, protoplasts were fixed 1 h on the glass slide with 4% paraformaldehyde in PBS (phosphate-buffered saline: 8 g L⁻¹ NaCl, 0.29 g L⁻¹ KCl, 1.45 g L⁻¹ Na₂HPO₄, 0.24 g L⁻¹ KH₂PO₄) and washed four times with PBS. Then, protoplasts were sequentially incubated 10 min with 0.5% Triton X100 in PBS, with 1% BSA and 3% half-milk in PBS, and washed three times with 3% BSA in PBS.

Immunostaining and confocal microscopy. Protoplasts were incubated overnight at 4°C, with the primary antibody CCRC-M86 diluted at 1/10 in PBS containing 1% BSA, 3% normal goat serum (NGS). After six washes in PBS containing 1% BSA, protoplasts were incubated 1 h at 25°C with a secondary antibody (goat IgG anti-rat TRITC conjugate from Sigma) diluted at 1/50 in PBS containing 1% BSA, 3% NGS. Finally protoplasts were washed three times in PBS containing 1% BSA. Observation of XyG-epitope staining was done using a Leica TCS SP2 AOBS confocal laser

scanning microscope. TRITC fluorescence was imaged using an excitation wavelength of 543 nm with the emission wavelength at 565–585 nm.

High pressure freezing (HPF) and freeze substitution (FS)

Pre-cooling treatment prior to HPF. Before use, 3-day-old tobacco (BY-2) suspension cultured cells were checked for their GFP expression based on fluorescence observation by confocal microscopy. GFP expressing cells were then concentrated on 50 μm nylon membrane and incubated successively in 5% and 10% glycerol for 1 h at +4°C. Cells were subsequently transferred to 20% glycerol and immediately frozen.

High-pressure freezing. High-pressure freezing was performed with the freezer HPF-EM PACT I Leica-microsystems (Studer *et al.*, 2001). Tobacco BY-2 cells pre-treated were concentrated on 50 μm nylon membrane and transferred into the cavity of a copper ring used for cryofracture which is 100 μm in depth and 1.2 mm in diameter. Excess medium was lightly absorbed by filter paper. Using a horizontal loading station, the specimen carriers were tightened securely to the pod of specimen holder. After fixation on the loading device, specimens were frozen according to a maximum cooling rate of 10 000°C sec⁻¹, incoming pressure of 7.5 bars and working pressure of 4.8 bars. Rings containing frozen samples were stored in liquid nitrogen until the freeze substitution procedure was initiated.

Freeze substitution. After high-pressure freezing, samples were transferred to a freeze substitution automate (AFS, Leica, <http://www.leica-microsystems.com>) pre-cooled to -140°C. Freeze substitution conditions followed a modified procedure of Studer *et al.* (2001). Samples were substituted in anhydrous acetone +0.5% uranyl acetate at -90°C for 72 h. The temperature was gradually raised (2°C h⁻¹) to -60°C and stabilized during 12 h, then gradually raised (2°C h⁻¹) to -30°C (12 h) and gradually raised again (2°C h⁻¹) to -15°C for 2 h and finally rinsed twice with anhydrous ethanol. Infiltration was processed at -15°C in a solution containing ethanol:London Resin White (LRW) (ratio 2:1; 1:1; 1:2, 8 h each step) and with pure resin for 2 \times 24 h. Polymerisation was performed into the AFS apparatus at -15°C under ultra violet light for 48 h.

Immunogold labelling of xyloglucan epitopes

Ultrathin sections (50–70 nm; ultracut UCT, Leica) of tobacco cells were collected on to carbon-formvar-coated nickel grids and blocked in TBS (Tris-buffered saline: Tris-HCl 20 mM pH 7.2, 200 mM NaCl) supplemented with 0.2% of BSA and milk 3% for 30 min. Sections were then incubated with the monoclonal antibody CCRC-M86 at a 1/5 dilution in TBS + BSA and normal goat serum (NGS) for 3 h at room temperature. After washing in TBS + BSA 0.2% buffer, grids were incubated for 1 h at room temperature in the rat secondary antibody conjugated to 10-nm gold particles (Tebu-British Biocell International, <http://www.tebu-bio.com>). After washing and fixation in TBS + 2% glutaraldehyde, sections were first stained with 4% vapour osmium for 3 h followed by classical staining using uranyl acetate and lead citrate. Sections were observed in a Philips, FEI Tecnai 12 Biotwin transmission electron microscope operating at 80 kV, with ES500W Erlangshen CCD camera (Gatan).

Immunogold labelling of GFP-tagged proteins

Ultrathin sections (50–70 nm; ultracut UCT, Leica, Vienna, Austria) of frozen cells expressing AtXT1-GFP, AtMUR3-GFP or AtFUT1-

GFP fusion proteins were collected on to carbon-formvar-coated nickel grids and blocked in TBS (Tris-HCl 20 mM pH 7.2, 200 mM NaCl) supplemented with 0.2% of BSA and Tween 20 0.05% for 15 min. Sections were then incubated with the polyclonal anti-GFP antibody (BD living colors A.v peptide antibody – Clontech) at a 1/5 dilution in TBS + BSA and normal goat serum (NGS; British Biocell International) for 2 h at room temperature. After washing in TBS + BSA 0.2% buffer, grids were incubated for 1 h at room temperature in the rabbit secondary antibody conjugated to 10 nm gold particles (Tebu-British Biocell International). After washing and fixation in TBS + 2% GA, sections were stained as described above.

Quantifying immunogold labelling and statistic analysis

Quantification, specificity and statistical analysis of Golgi labelling were assessed using the method of Mayhew *et al.* (2002).

Labelling specificity of signal in transformed BY-2 cells. To evaluate the distribution of gold particles in Golgi stacks of transformed cells as compared with wild type cells, we used a chi-squared test (Mayhew *et al.*, 2002). We considered the null hypothesis as 'no difference of gold distribution between wild type and transformed cells'.

We analyzed gold labelling in different compartments of Golgi stacks: *cis*, medial, *trans* and the TGN. To compare distribution of gold particles between the two tobacco lines in these compartments, we created a contingency table (two columns \times four rows) as described in Mayhew *et al.* (2002). In this analysis, the expected gold count at two line cells for each selected Golgi compartment are calculated from the product of column (total gold particles observed in all Golgi stacks for wild type or transformed tobacco line) and row totals (total gold particles observed in all BY-2 lines for the selected compartment) divided by the grand total (total gold particles observed in four Golgi compartments, in wild type and transformed BY-2 cells). The corresponding partial chi-squared value is calculated as the square of the difference between observed and expected gold particle numbers divided by the expected gold number. The total chi-squared value was compared with chi-squared value in contingency table analysis, with a degree of freedom equal to 3 (see Mayhew *et al.*, 2002).

Determination of fusion protein distribution in Golgi stacks

Quantification of labelling was done according to Mayhew *et al.* (2002), on a total of 50 Golgi stacks with distinguishable subtypes of cisternae. First, gold particles were counted in each Golgi compartment (*cis*, medial, *trans* and the TGN) and represented the 'observed golds particles' (n_o). Second, a lattice of test points was superimposed on each Golgi stacks (so as to be random in position); hit points were counted ('Observed points', P) in each compartment of Golgi stacks. Then, the 'expected golds particles' (n_e) (i.e. random distribution) is calculated as followed: $n_e = (P \times n_o \text{ total}) / P_{\text{total}}$. Observed and expected gold particles distributions allowed calculation of the relative labelling index: RLI (n_o/n_e) for each compartment. For a random distribution, the relative labelling index (RLI) is inferior or equal to 1, and for a compartment preferentially labelled RLI is superior to 1.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Yumiko Sakuragi (Department of Plant Biology and Biotechnology/Laboratory for Molecular Plant Biology, Copenhagen, Denmark) for providing us with the Golgi marker sialyltransferase fused to YFP (ST-YFP) and Pr. M. Hahn for providing CCRC-M86 antibody. Dr V. Gomord and S. Pagny (University

of Rouen) are acknowledged for helpful advices during early days of this work. Dr L. Galas and Dr J. Moore are also acknowledged for their help with confocal imaging and for critical reading of the manuscript. This work was supported by the University of Rouen, the CNRS and le GRR VATA 'Végétal, Agronomie et transformation des Agroressources' de la Région de Haute Normandie.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Figure S1. Immunodot blot analysis of the binding of the mAb CCRC-M86 to xyloglucan.

Table S1. Quantitative analysis of anti-GFP labelling over Golgi stacks in tobacco BY-2 cells expressing AtFUT1-GFP.

Please note: As a service to our authors and readers, this journal provides supporting information supplied by the authors. Such materials are peer-reviewed and may be re-organized for online delivery, but are not copy-edited or typeset. Technical support issues arising from supporting information (other than missing files) should be addressed to the authors.

REFERENCES

- Ali, M.S., Mitsui, T. and Akazawa, T. (1986) Golgi-specific localization of transglycosylases engaged in glycoprotein biosynthesis in suspension-cultured cells of sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.). *Arch. Biochem. Biophys.* **251**, 421–431.
- Andreeva, A.V., Kutuzov, M.A., Evans, D.E. and Hawes, C.R. (1998) The structure and function of the Golgi apparatus: a hundred years of questions. *J. Exp. Bot.* **49**, 1281–1291.
- Brummell, D.A., Camirand, A. and MacLachlan, G.A. (1990) Differential distribution of xyloglucan glycosyltransferase in pea Golgi dictyosomes and secretory vesicles. *J. Cell Sci.* **96**, 705–710.
- Camirand, A. and MacLachlan, G. (1986) Biosynthesis of the fucose-containing xyloglucan nonasaccharide by pea microsomal membranes. *Plant Physiol.* **82**, 379–383.
- Camirand, A., Brummell, D. and MacLachlan, G. (1987) Fucosylation of xyloglucan: localization of the transferase in dictyosomes of pea stem cells. *Plant Physiol.* **84**, 753–756.
- Cavalier, D.M. and Keegstra, K. (2006) Two xyloglucan xylosyltransferase catalyze the addition of multiple xylosyl residues to a cellobiohexose. *J. Biol. Chem.* **281**, 34197–34207.
- Cocuron, J.C., Lerouxel, O., Drakakaki, G., Alonso, A.P., Liepman, A.H., Keegstra, K., Raikhel, N. and Wilkerson, C.G. (2007) A gene from the cellulose synthase-like C family encodes a beta-1,4 glucan synthase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **104**, 8550–8555.
- Cosgrove, D.J. (2005) Growth of the plant cell wall. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 850–861.
- Driouich, A., Zhang, G.F. and Staehelin, L.A. (1993) Effect of brefeldin A on the structure of the Golgi apparatus and on the synthesis and secretion of proteins and polysaccharides in sycamore maple suspension-cultured cells. *Plant Physiol.* **101**, 1363–1373.
- Edwards, M.E., Dickson, C.A., Chengappa, S., Sidebottom, C., Gidley, M.J. and Reid, G.J.S. (1999) Molecular characterization of a membrane-bound galactosyltransferase of plant cell wall matrix polysaccharide biosynthesis. *Plant J.* **19**, 691–697.
- Faik, A., Price, N.J., Raikhel, N.V. and Keegstra, K. (2002) An Arabidopsis gene encoding an α -xylosyltransferase involved in xyloglucan biosynthesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **99**, 7797–7802.
- Farkas, V. and MacLachlan, G. (1988) Fucosylation of exogenous xyloglucans by pea microsomal membranes. *Arch. Biochem. Biophys.* **264**, 48–53.
- Follet-Gueye, M.L., Pagny, S., Faye, L., Gomord, V. and Driouich, A. (2003) An improved chemical fixation method suitable for immunogold localization of green fluorescent protein in the Golgi apparatus of tobacco bright yellow (BY-2) cells. *J. Histochem. Cytochem.* **51**, 931–940.
- Fry, S.C., York, W.S., Albersheim, P. et al. (1993) An unambiguous nomenclature for xyloglucan-derived oligosaccharides. *Physiol. Plant.* **89**, 1–3.
- Gomord, V., Fitchette-Laine, A.C., Denmat, L.A., Michaud, D. and Faye, L. (1998) Production of foreign proteins in tobacco cell suspension culture. In *Methods in Biotechnology*, vol. 3 (Cunningham, C. and Porter, A.J.R., eds). Totowa NJ: Humana Press, pp. 155–164.
- Hayashi, T. and Matsuda, K. (1981) Biosynthesis of xyloglucan in suspension-cultured soybean cells: occurrence and some properties of xyloglucan 4- β -D-glucosyltransferase and 6- α -D-xylosyltransferase. *J. Biol. Chem.* **256**, 1117–1122.
- Hayashi, T., Kato, Y. and Matsuda, K. (1981) Biosynthesis of xyloglucan in suspensions-cultured soybean cells. An assay method for xyloglucan xylosyltransferase and attempted synthesis of xyloglucan from UDP-D-xylose. *J. Biochem.* **89**, 325–328.
- Hayashi, T., Koyama, T. and Matsuda, K. (1988) Formation of UDP-Xylose and xyloglucan in soybean Golgi membranes. *Plant Physiol.* **87**, 341–345.
- Hoffman, M., Jia, Z., Pena, M.J., Cash, M., Harper, A., Blackburn, A.R. II, Darvill, A. and York, W.S. (2005) Structural analysis of xyloglucans in primary cell walls of plants in the subclass Asteridae. *Carbohydr. Res.* **340**, 1826–1840.
- Lerouxel, O., Choo, T.S., Séveno, M., Usabel, B., Faye, L., Lerouge, P. and Pauly, M. (2002) Rapid structural phenotyping of plant cell wall mutants by enzymatic oligosaccharide fingerprinting. *Plant Physiol.* **130**, 1754–1763.
- Lerouxel, O., Cavalier, D.M., Liepman, A.H. and Keegstra, K. (2006) Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides: a complex process. *Curr. Opin. Plant Biol.* **9**, 621–630.
- Lynch, M.A. and Staehelin, L.A. (1992) Domain-specific and cell type specific localization of two types of cell wall matrix polysaccharides in the clover root tip. *J. Cell Biol.* **118**, 467–479.
- Madson, M., Dunand, C., Li, X., Verma, R., Vanzin, G.F., Caplan, J., Shoue, D.A., Carpita, N.C. and Reiter, W.D. (2003) The *MUR3* gene of Arabidopsis encode a xyloglucan galactosyltransferase that is evolutionarily related to animal exostosins. *Plant Cell*, **15**, 1662–1670.
- Mayhew, T.M., Lucocq, J.M. and Griffiths, G. (2002) Relative labelling index: a novel stereological approach to test for non-random immunogold labelling of organelles and membranes on transmission electron microscopy thin sections. *J. Microsc.* **205**, 153–164.
- Moore, P.J. and Staehelin, L.A. (1988) Immunogold localization of the cell wall matrix polysaccharides rhamnogalacturonan I and xyloglucan during cell wall expansion and cytokinesis in *Trifolium pratense* L.: implications for secretory pathways. *Planta*, **174**, 433–445.
- Moore, P.J., Darvill, A.G., Albersheim, P. and Staehelin, L.A. (1986) Immunogold localization of xyloglucan and rhamnogalacturonan I in the cell walls of suspension-cultured sycamore cells. *Plant Physiol.* **82**, 787–794.
- Nebenführ, A., Gallagher, L., Dunahay, T.G., Frohlick, J.A., Mazurkiewicz, A.M., Meehl, J.B. and Staehelin, L.A. (1999) Stop-and-go movements of plant Golgi stacks are mediated by the acto-myosin system. *Plant Physiol.* **121**, 1127–1141.
- Nguema-Ona, E., Andeme-Onzighi, C., Aboughe-Angone, S., Bardor, M., Ishii, T., Lerouge, P. and Driouich, A. (2006) The *reb1-1* mutation of Arabidopsis: effect on the structure and the localization of galactose containing cell wall polysaccharides. *Plant Physiol.* **140**, 1406–1417.
- Pagny, S., Cabanes-Macheteau, M., Gillikin, J.W., Leborgne-Castel, N., Lerouge, P., Boston, R.S., Faye, L. and Gomord, V. (2000) Protein recycling from the Golgi apparatus to the endoplasmic reticulum in plants and its minor contribution to calreticulin retention. *Plant Cell*, **12**, 739–756.
- Pagny, S., Bouissoni e, F., Sarkar, M., Follet-Gueye, M.L., Driouich, A., Schachter, H., Faye, L. and Gomord, V. (2003) Structural requirements for Arabidopsis β -1,2 xylosyltransferase activity and targeting to the Golgi. *Plant J.* **33**, 189–203.
- Palmer, E. and Freeman, T. (2004) Investigation into the use of C- and N-terminal GFP fusion proteins for subcellular localization studies using reverse transfection microarrays. *Comp. Funct. Genomics*, **5**, 342–353.
- Pattathil, S., Avci, U., Baldwin, D. et al. (2010) A comprehensive toolkit of plant cell wall glycan-directed monoclonal antibodies. *Plant Physiol.* **153**, 514–525.
- Perrin, R.M., DeRocher, A.E., Bar-Peled, M., Zeng, W., Norambuena, L., Orellana, A., Raikhel, N.V. and Keegstra, K. (1999) Xyloglucan fucosyltransferase, an enzyme involved in plant cell wall biosynthesis. *Science*, **284**, 1976–1979.
- Ray, P.M. (1980) Cooperative action of beta-glucan synthetase and UDP-xylose xylosyl transferase of Golgi membranes in the synthesis of xyloglucan-like polysaccharide. *Biochim. Biophys. Acta* **629**, 431–444.
- Ray, B., Loutelier-Bourhis, C., Lange, C., Condamine, E., Driouich, A. and Lerouge, P. (2004) Structural investigation of hemicellulosic

- polysaccharides from *Argania spinosa*: characterisation of a novel xyloglucan motif. *Carbohydr. Res.* 339, 201–208.
- Saint-Jore-Dupas, C., Nebenführ, A., Boulaflois, A., Follet-Gueye, M.L., Plasson, C., Hawes, C., Driouich, A., Faye, L. and Gomord, V. (2006) Plant N-glycan processing enzymes employ different targeting mechanisms for their spatial arrangement along the secretory pathway. *Plant Cell*, 18, 3182–3200.
- Sarria, R., Wagner, T.A., O'Neill, M.A., Faik, A., Wilkerson, C.G., Keegstra, K. and Raikhel, N.V. (2001) Characterization of a family of Arabidopsis genes related to xyloglucan fucosyltransferase. *Plant Physiol.* 127, 1595–1606.
- Seifert, G.J., Barber, C., Wells, B. and Roberts, K. (2004) Growth regulators and the control of nucleotide sugar flux. *Plant Cell*, 16, 723–730.
- Sims, I.M., Munro, S.L.A., Currie, G., Craik, D. and Bacic, A. (1996) Structural characterization of xyloglucan secreted by suspension-cultured cells of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Carbohydr. Res.* 293, 147–172.
- Staehelin, L.A. and Driouich, A. (1997) Brefeldin A effects in plants (are different Golgi responses caused by different sites of action?). *Plant Physiol.* 114, 401–403.
- Staehelin, L.A., Giddings, T.H. Jr, Kiss, J.Z. and Sack, F.D. (1990) Macromolecular differentiation of Golgi stacks in root tip of *Arabidopsis* and *Nicotiana* seedlings as visualized in high pressure frozen and freeze-substituted samples. *Protoplasma*, 157, 75–91.
- Studer, D., Graber, W., Al-Amoudi, A. and Egli, P. (2001) A new approach for cryofixation by high-pressure freezing. *J. Microsc.* 203, 285–294.
- Tamura, K., Shimada, T., Kondo, M., Nishimura, M. and Hara-Nishimura, I. (2005) KATAMARI1/MURUS3 is a novel Golgi membrane protein that is required for endomembrane organization in Arabidopsis. *Plant Cell*, 17, 1764–1776.
- Vanzin, G.F., Madson, M., Carpita, N.C., Keegstra, K. and Reiter, W.D. (2002) The *mur2* mutant of *Arabidopsis thaliana* lacks fucosylated xyloglucan because of a lesion in fucosyltransferase AtFUT1. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 99, 3340–3345.
- Winicur, Z.M., Zhang, G.F. and Staehelin, A. (1998) Auxin deprivation induces Golgi differentiation in suspension-cultured tobacco BY-2 cells. *Plant Physiol.* 117, 501–513.
- Zabotina, O.A., van de Ven, W.T., Freshour, G., Drakakaki, G., Cavalier, D., Mouille, G., Hahn, M.G., Keegstra, K. and Raikhel, N.V. (2008) Arabidopsis XXT5 gene encodes a putative alpha-1,6-xylosyltransferase that is involved in xyloglucan biosynthesis. *Plant J.* 56, 101–115. Erratum in *Plant J.* (2009) 57, 386.
- Zhang, G.F. and Staehelin, L.A. (1992) Functional compartmentation of the Golgi apparatus of plant cells: immunocytochemical analysis of high-pressure frozen- and freeze-substituted sycamore maple suspension culture cells. *Plant Physiol.* 99, 1070–1083.

ARTICLE

An Improved Chemical Fixation Method Suitable for Immunogold Localization of Green Fluorescent Protein in the Golgi Apparatus of Tobacco Bright Yellow (BY-2) Cells

Marie-Laure Follet-Gueye, Sophie Pagny, Loïc Faye, Véronique Gomord, and Azeddine Driouich

CNRS UMR 6037, IFRMP23, Université de Rouen, UFR des Sciences, Centre Commun de Microscopie Electronique, Mont-Saint-Aignan, France

SUMMARY In plant systems, the green fluorescent protein (GFP) is increasingly used as a marker to study dynamics of the secretory apparatus using fluorescence microscopy. The purpose of this study was to immunogold localize the GFP, at the electron microscopic level, in a line of tobacco BY-2-cultured cells, expressing a GFP-tagged Golgi glycosyltransferase. To this end we have developed a simple, one-step chemical fixation method that allow good structural preservation and specific labeling with anti-GFP antibodies. Using this method, we have been able to show that an *N*-glycan GFP-tagged xylosyltransferase is specifically associated with Golgi stacks of BY-2 transformed cells and is preferentially located in medial cisternae. As an alternative to cryofixation methods, such as high-pressure freezing, which requires specialized and expensive equipment not available in most laboratories, this method offers researchers the opportunity to investigate GFP-tagged proteins of the endomembrane system in tobacco BY-2 cells. (J Histochem Cytochem 51:931–940, 2003)

KEY WORDS

Golgi
green fluorescent protein
glycosyltransferases
immunogold
microscopy
plant

IN PLANT CELLS, the secretory system (endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, transport vesicles) is involved in processing, sorting, and transport of glycoproteins and non-cellulose matrix polysaccharides of the cell wall (Driouich et al. 1993; Nebenführ et al. 1999). The functional organization of the secretory apparatus relies on different proteins, such as chaperones of the endoplasmic reticulum (ER) and glycosyltransferases of the Golgi apparatus. Knowledge of the function and localization of such proteins is increasingly studied through the use of reporter proteins expressed in transgenic plants (Gomord et al. 1997; Boevink et al. 1998; Nebenführ et al. 1999; Batoko et al. 2000; Brandizzi et al. 2002a; Ritzenthaler et al. 2002). *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana tabacum*

Bright Yellow (BY-2) cells are currently the two major plant cell systems used for expression of various recombinant proteins. The use of BY-2 cells presents advantages over that of *Arabidopsis* because cells in culture can be highly synchronized and are easily transformable (Gomord et al. 1998; Geelen and Inzé 2001). Green fluorescent protein (GFP) from the jellyfish *Aequorea victoria* and its variants are commonly employed as markers to localize proteins in transgenic BY-2 cells expressing XFP-tagged proteins using confocal fluorescence microscopy (Kost et al. 1998; Granger and Cyr 2000; Zuo et al. 2000; Criqui et al. 2001; Brandizzi et al. 2002b; Pagny et al. 2003). However, the ultrastructural organization of cell organelles is below the resolution of confocal microscopy and only immunocytochemistry at the electron microscopic (EM) level allows the mapping of GFP-tagged proteins within a specific organelle, such as the Golgi apparatus. To date, a few studies related to the EM immunogold localization of GFP-tagged proteins have been published (Boevink et al. 1998; Nebenführ et al. 1999; Paupard et al. 2001; Pagny et al. 2003).

Correspondence to: Pr. Azeddine Driouich, CNRS UMR 6037-IFRMP 23, Université de Rouen, UFR des Sciences, Centre Commun de Microscopie Electronique, 76821 Mont St Aignan Cedex, France. E-mail: Azeddine.Driouich@univ-rouen.fr

Received for publication January 16, 2003; accepted March 5, 2003 (3A5999).

A central issue for immunolocalization at the EM level is to preserve the epitope of interest while minimizing the loss of ultrastructural details. There are several strategies for the preparation of biological samples destined for immunogold labeling of proteins. These include (a) chemical fixation with aldehyde followed by progressive dehydration and embedding under low-temperature conditions (Carlemalm et al. 1982), (b) a brief chemical fixation with aldehyde followed by cryofixation and cryosectioning (Tokuyasu 1973), and (c) cryofixation techniques followed by freeze-substitution or freeze drying and embedding at low temperatures (Quintana 1994). The goals of these strategies are to stabilize the protein structure, retain protein antigenicity, and allow accessibility to antibodies. Compared to classical chemical fixation, the use of low temperature in cryomethods enhances the stability of biological material during solvent exchange and generates a minimal loss of macromolecular structures. Many of the cryotechniques are difficult to carry out in the majority of plant samples, which are more hydrated than animal specimens. There is, however, a general agreement that high-pressure freezing and freeze substitution (HPF/FS) provides the best preservation of cellular ultrastructures and antigenicity (Staehelin et al. 1990; Zhang and Staehelin 1992; Zhang et al. 1993; Driouich et al. 1993; Driouich and Staehelin 1997). Recently, the use of HPF/FS techniques has allowed the EM immunocytochemical localization of GFP in transgenic tobacco BY-2 cells (Nebenführ et al. 1999). However, this technique requires specialized and expensive equipment, which is not routinely available in most EM laboratories, whereas the need for localizing GFP-tagged proteins in transgenic plants is increasing. Therefore, it is important to develop alternative chemical fixation methods able to yield an optimal preservation of both the ultrastructures and antigenic sites. In this study we describe a one-step chemical fixation method for tobacco BY-2 cells, which consists of fixing cells in a mixture of glutaraldehyde and osmium at a low temperature. We show that this method allows an improved structural preservation of the endomembrane system and that the anti-GFP antibodies bind with high specificity, thereby allowing the localization of GFP-tagged glycosyltransferases within individual Golgi cisternae. The method can be easily applied in most laboratories without specialized equipment.

Materials and Methods

Growth Conditions

Cells were harvested by low-speed centrifugation (for 2 min) 3–5 days after subculturing and immediately used for experiments.

Construction of the XylT36::GFP and Transformation of Plant Cells

The fusion protein consisting of the first 36 amino acids of AtXylT (β 1-2 xylosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*) fused to the GFP (XylT36::GFP) was constructed as described in Pagny et al. (2003). The construct XylT36::GFP was used to transform *Agrobacterium tumefaciens* (LBA4404) (Höfgen and Willmitzer 1988). Transformation of tobacco BY-2 cells and initiation of suspension cultures of transgenic tobacco cells were performed as previously described (Gomord et al. 1998).

Production of Antibodies Directed Against GFP

The specific anti-GFP polyclonal antibodies were prepared in rabbits using commercial GFP (Q-biogen; Illkirch, France). The procedure of antibody preparation was as described in Faye et al. (1993).

Protein Extraction, SDS-PAGE, and Western blotting Analysis

Cell extracts were prepared as described in Gomord et al. (1997). Proteins were precipitated with TCA (12.5%) and solubilized in denaturing buffer (SDS 3 × buffer; Pharmacia, Uppsala, Sweden). SDS-PAGE separation of proteins was performed according to Laemmli (1970). Electroblooming and immunodetection with the anti-GFP antibodies were carried out as previously described (Faye et al. 1993).

Fluorescence Microscopy

Five-day-old tobacco BY-2 cells expressing the fusion protein XylT36::GFP were observed using the standard fluorescein isothiocyanate filter set. Image acquisitions were done with a Leica DMRB microscope coupled to an ORCA-ER CCD camera (C4742-95-12ER, Hamamatsu).

Sample Preparation for Electron Microscopy

Transgenic BY-2 cells expressing GFP-tagged Golgi glycosyltransferase were fixed in the dark for 30 min, 60 min, or 120 min at 4°C in a solution consisting of 1% glutaraldehyde and 1% osmium tetroxide in 0.1 M Na cacodylate buffer, pH 7.2. This mixture was prepared and used immediately. After washing in distilled H₂O, the samples were gradually dehydrated in 10%, 20%, and 40% aqueous ethanol (10 min in each bath), then in 60% and 80% (20 min in each bath), and finally in anhydrous ethanol for 30 min. After dehydration the samples were embedded in London Resin White (LRW) or Spurr resin. For the embedding in Spurr, cells were incubated twice in anhydrous acetone (5 min each), then infiltrated overnight at 4°C in a mixture of Spurr and acetone (1/1) (v/v). Finally, the cells were bathed twice in pure and fresh resin (1 hr each). Polymerization was carried out at 60°C for 24 hr. For the embedding in LRW, fixed and dehydrated cells were infiltrated at 4°C in a mixture of LRW and ethanol, (1/2) (v/v) for 1.5 hr and (2/1) (v/v) for 1 hr. The cells were then incubated twice in pure resin overnight followed by 4 hr at 4°C. Polymerization was carried out at 4°C under UV light for 48 hr.

Electron Microscopy and Immunogold Labeling

Ultrastructural Observations. Ultrathin sections (80–90 nm) from Spurr and LRW-embedded samples were collected on formvar-coated copper grids and post-stained in 2% aqueous uranyl acetate and Reynold's lead citrate. Sections were examined at 80kV in a Philips electron microscope (Technai 12) at CCME (Rouen University; Rouen, France).

Detection of Complex N-glycans and Cell Wall Polysaccharides. The antibodies used were the rat monoclonal antibody JIM7 (Knox et al. 1990) specific for homogalacturonans, the rabbit polyclonal antibodies, anti-bupleuran, raised against a pectin polysaccharide of rhamnogalacturonan-I (RG-I) type (Sakurai et al. 1998), the rabbit polyclonal antibody anti-xyloglucan (Moore et al. 1986), and the purified polyclonal antibody specific for β 1,2 xylose residues of plant N-glycans (Faye et al. 1993). The immunolabeling procedure of carbohydrate epitopes was as previously described (Zhang and Staehelin 1992; Vicré et al. 1998) with the following concentrations of antibodies: 1:20 for anti-xyloglucan, 1:10 for anti- β 1,2 xylose, 1:100 for anti-bupleuran, and pure JIM7.

Immunolocalization of GFP. The anti-GFP antibody used in this study is a rabbit polyclonal serum produced in our laboratory. Formvar-coated 300-mesh nickel grids carrying ultrathin sections (90 nm) of LRW-embedded transgenic tobacco BY-2 were incubated in 0.5 M Na-metaperiodate (NaIO₄) for 30 min to remove excess fixatives. After washing in distilled H₂O (twice for 10 min), grids were transferred to a 0.1 N HCl solution for 10 min to remove excess osmium tetroxide. Grids were then washed briefly and first blocked in 0.1 M glycine in PBS (0.01 M Na-phosphate, pH 7.2, and 0.15 M NaCl) containing 0.1% (v/v) Triton X-100 for 15 min to inactivate residual aldehydes. After washing in PBS containing 0.1% (v/v) Triton X-100 for 5 min, sections were blocked with the second blocking buffer solution consisting of normal goat serum (British Biocell; Cardiff, UK) 1:30 in PBS containing 0.1% (w/v) BSA and 0.2% (v/v) Tween-20 for 45 min. Grids were then incubated in the primary anti-GFP antibodies diluted 1:100 in the second blocking buffer at 4°C overnight. A control was performed under the same conditions with the rabbit preimmune serum diluted 1:100 in the first blocking buffer solution. The grids were then washed once in PBS containing 0.1% (v/v) Triton X-100 for 5 min, then twice in TBS (0.05 M Tris-HCl, pH 8.4, and 0.15 M NaCl) containing 0.1% (v/v) Triton X-100 for 15 min each, and blocked for 45 min with the third blocking buffer solution consisting of normal goat serum (British Biocell) 1:30 in TBS containing 1% (w/v) BSA, 0.1% (v/v) Triton X-100, and 0.2% (v/v) Tween-20. The sections were then transferred to a droplet of goat anti-rabbit IgG conjugated to 10-nm gold particles (British Biocell) diluted 1:25 in the third blocking buffer solution for 2 hr at room temperature. After three washes in PBS containing 0.1% (v/v) Triton X-100 for 20 min and two washes in distilled H₂O for 20 min, grids were finally post-stained and examined as described above.

Results

Ultrastructural Features of Tobacco BY-2 Cells

We first examined the ultrastructural features of tobacco BY-2 cells co-fixed with a glutaraldehyde/osmium mixture and embedded in Spurr resin (Figure 1). After 30 min of fixation, most if not all cell compartments were well preserved. The endomembranes, including nuclear envelope, the plasma membrane, tonoplast, Golgi stacks, and the endoplasmic reticulum (ER) were consistently discernable (Figures 1A and 1B). A slight swelling of the ER, which is a common phenomenon of fixation, was observed at different times of fixation (Figures 1A 1C, and 1E). In the context of this article, it is worth noting that the organization of Golgi stacks was typical of plant suspension-cultured cells (Zhang and Staehelin 1992; Driouich et al. 1993). As seen in Figure 1D, different subtypes of Golgi cisternae, *cis*, medial, and *trans*, can be identified on the basis of their staining patterns as characterized earlier (Staehelin et al. 1990; Zhang and Staehelin 1992). It is also worth noting that cortical microtubules were well preserved and were frequently more visible at fixation times of 60 min or more (Figures 1F and 1G).

We also examined the ultrastructure of the same cells embedded in LRW resin, which is more amenable to immunogold labeling. In LRW-embedded cells, although some cytoplasmic extraction was observed, Golgi stacks and ER were quite well preserved and clearly distinguishable. As illustrated in Figure 2, even though the quality of structural preservation did not match that of the Spurr-embedded cells (Figure 1 and 2B), the *cis*-to-*trans* polarity of Golgi stacks as well as subtypes of Golgi cisternae were identifiable. In most cases, the best preservation of these Golgi structures in LRW-embedded samples was obtained at a fixation time of 120 min (Figure 2A) vs 60 or 30 min of fixation.

Immunolocalization of Complex N-glycans and Cell Wall Polysaccharides

Before the immunolocalization of GFP, we checked whether the co-fixation protocol allowed classical immunogold labeling of plant cell wall polysaccharides and N-glycans both in the cell wall and Golgi stacks of tobacco BY-2 cells. As shown in Figures 3A and 3B, specific and heavy immunogold labeling was found over Golgi cisternae and the cell wall using antibodies directed either against xyloglucan, the major hemicellulose polysaccharide in primary walls of dicots (Moore et al. 1986), or against β 1-2 xylose residues of plant N-glycans (Faye et al. 1993). Similarly, anti-bupleuran antibodies raised against a pectin polysaccharide of RG-I type labeled Golgi cisternae as well as the entire cell wall (Figure 3C). The MAb JIM7, which

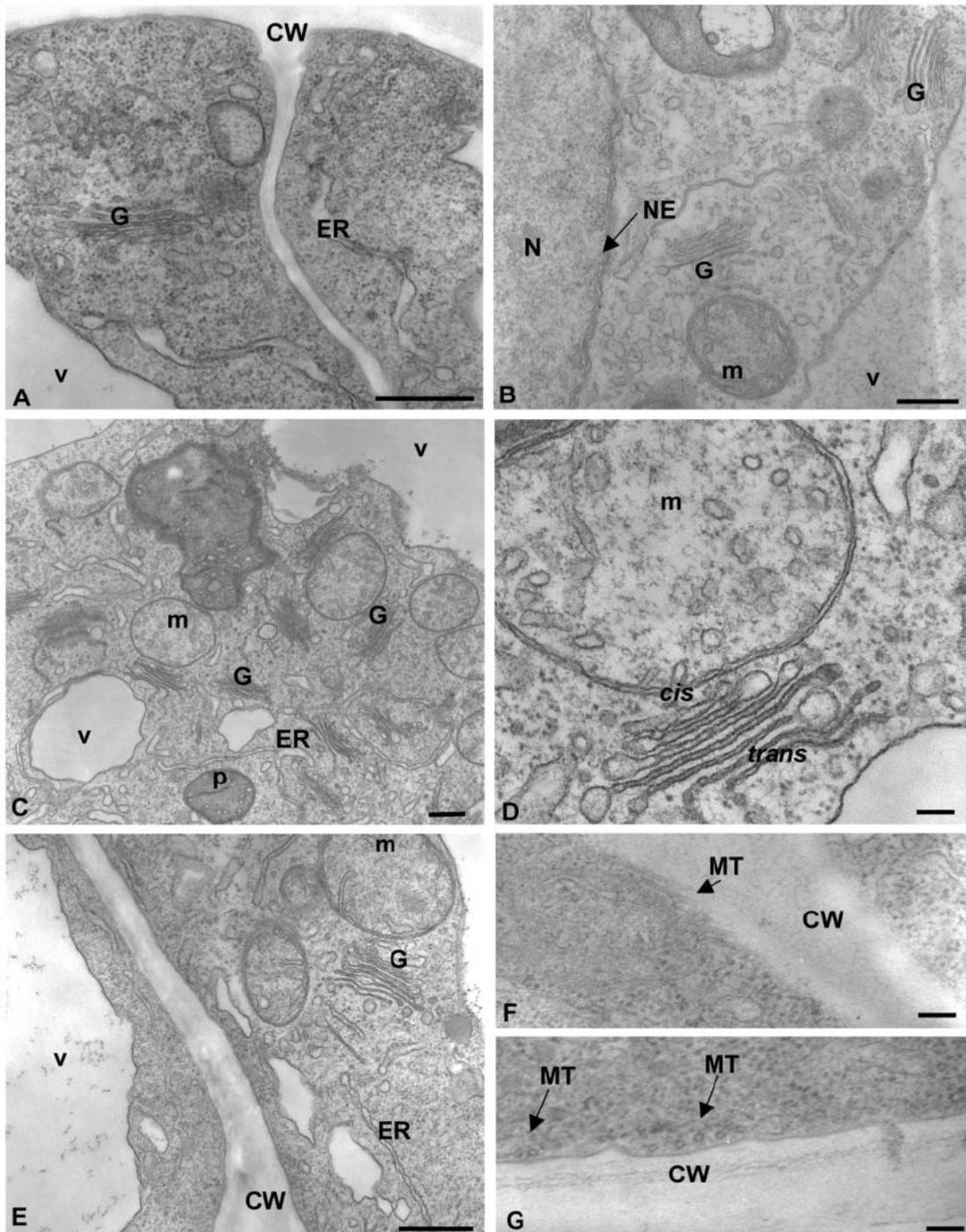


Figure 1 Electron micrographs of transformed suspension-cultured tobacco BY-2 cells preserved by the co-fixation technique. Cells were fixed for 30 (A,B), 60 (C,D), or 120 min (E-G) and embedded in Spurr resin. The micrographs illustrate typical examples of the cytoplasm of BY-2 cells in which different organelles can be clearly distinguished. Note that the morphology of Golgi stacks and the *cis-to-trans* polarity are well preserved in all samples. In F and G, cortical microtubules are viewed either longitudinally (F) or in cross-section (G) (arrows). CW, cell wall; ER, endoplasmic reticulum; G, Golgi stacks; m, mitochondria; MT, microtubules; N, nucleus; NE, nuclear envelope; P, plastid; V, vacuole. Bars: A-C = 0.5 μm ; D-G = 0.1 μm .

also recognizes pectins, showed sparse labeling of the cell wall (Figure 3D) and Golgi stacks (not shown). These results demonstrate that the co-fixation method is suitable for immunogold localization of sugar epitopes associated with either N-glycans or cell wall matrix polysaccharides.

Immunolocalization of Golgi-targeted GFP

Specificity of the Antibodies. Before investigating the immunogold localization of GFP on transformed tobacco BY-2 cells, we checked for the specificity of anti-GFP antibodies that we had produced in our laboratory, using immunoblotting technique. A total extract of intracellular proteins from non-transformed and transformed suspension-cultured BY-2 tobacco cells and a purified GFP, which was used for immunization, were probed on a Western blot with anti-GFP antibodies. As shown in Figure 4, the purified GFP (~29 kD), was also detected with the anti-GFP antibodies (Figure 4, Lane 1). Although no signal was obtained with the protein extract of wild-type tobacco cells (Figure 4, Lane 2), anti-GFP antibodies detected a major polypeptide in the intracellular fraction of transformed cells (Figure 4, Lane 3). This polypeptide, of ~32 kD, corresponds to the fusion protein AtXylT36::GFP. No immunostaining was observed with the preimmune control serum (not shown). These data demonstrate the specificity of anti-GFP antibodies.

Immunogold Localization of GFP. To investigate the immunogold localization of GFP, sections of transformed LRW-embedded BY-2 cells were immunolabeled with antibodies directed against GFP. We first performed and quantified the immunogold labeling over Golgi cisternae before and after a treatment with NaIO₄ and HCl. The data are presented as a histogram in Figure 5. In untreated samples, binding of anti-GFP antibodies to the Golgi cisternae was weak, with most of the stacks carrying about three gold particles. In contrast, after NaIO₄/HCl treatment, a much heavier labeling, four- to sevenfold higher than in untreated sections, was seen over the Golgi stacks. This demonstrates that the treatment was necessary to achieve significant and specific labeling of GFP within Golgi stacks in LRW-embedded cells. In addition, the density of GFP labeling seemed to be affected by the duration of fixation (Figure 5), with the highest density obtained with 60 min-fixed samples. When Spurr-embedded samples were used, GFP immunogold labeling was difficult to achieve and no significant labeling was obtained even after treatment with NaIO₄ and HCl (data not shown).

Figure 6B illustrates the typical immunogold labeling pattern obtained with anti-GFP antibodies on LRW-embedded transformed BY-2 cells. Labeling was

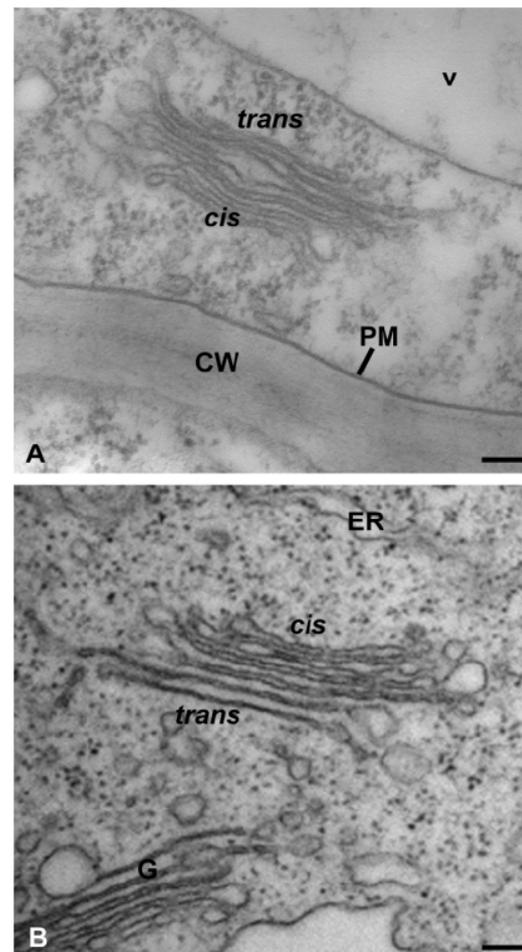


Figure 2 Electron micrographs of Golgi stacks in transformed suspension-cultured tobacco BY-2 cells preserved by the co-fixation technique. Cells were embedded either in LRW (A) or Spurr (B) resin. Although some extraction occurs in the cytoplasm, the morphology of the Golgi stacks is well preserved. Cells were fixed for 120 min. CW, cell wall; ER, endoplasmic reticulum; G, Golgi stacks; PM, plasma membrane. Bars = 0.1 μ m.

mostly found over the medial cisternae, with less over the *cis* and *trans* cisternae. The ER, tonoplast, and the vacuole were never labeled (Figure 6B). Scattered and very weak labeling was found over the plasma membrane and the cell wall with both anti-GFP and preimmune sera. Finally, no significant labeling was found in control experiments performed either using preimmune serum (Figure 5) or with the omission of the primary antibodies (not shown).

Together, the immunogold labeling results confirm that the punctate pattern of GFP fluorescence in BY-2 cells shown in Figure 6A corresponds indeed to dis-

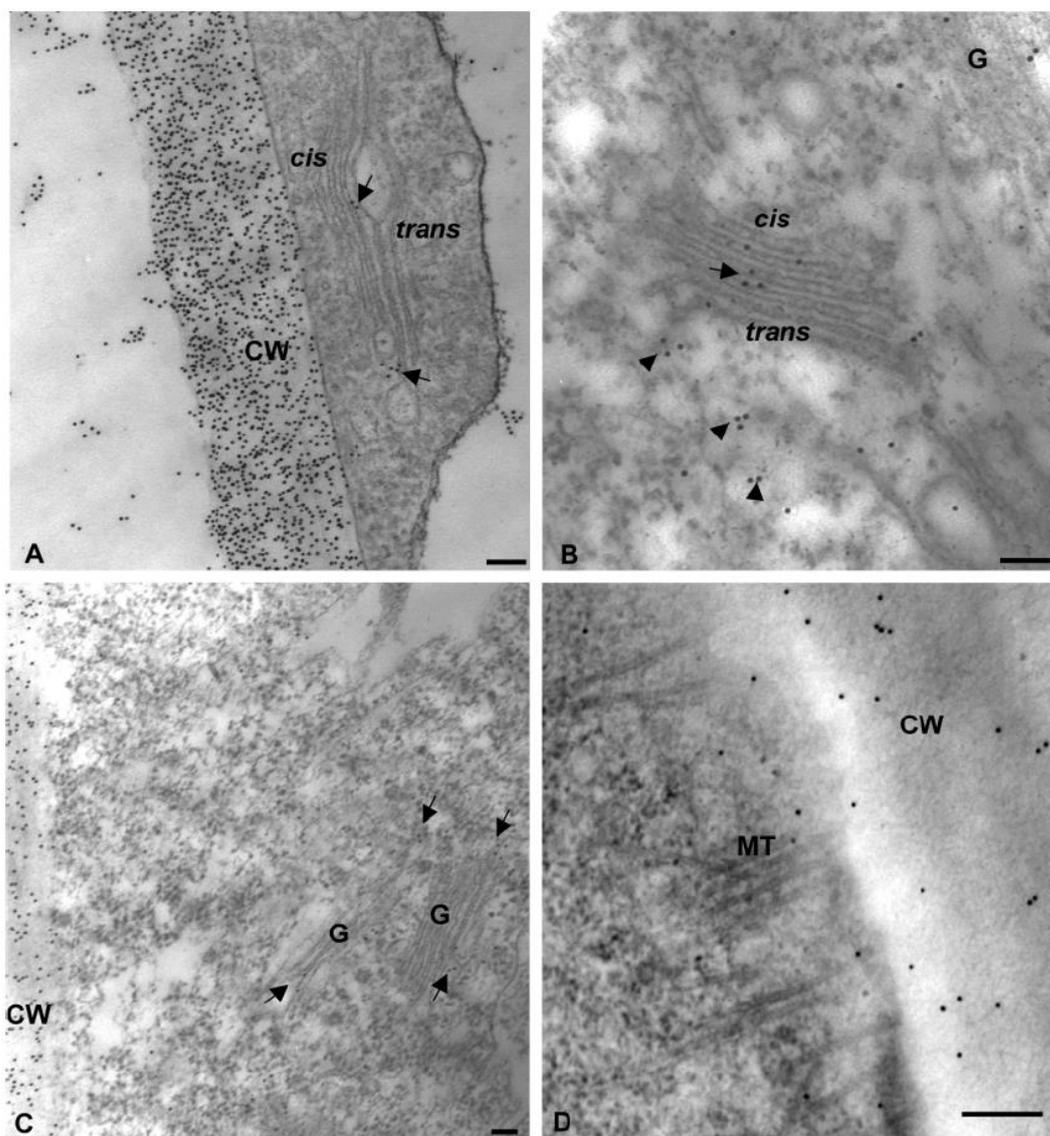


Figure 3 Immunogold labeling of Golgi stacks and cell walls with anti-polysaccharide and anti-*N*-glycan antibodies. (A) Labeling with the polyclonal antibody, anti-xyloglucan. (B) Labeling with the polyclonal antibodies specific for β 1-2 xylose residues of plant *N*-glycans. (C) Labeling with the polyclonal anti-pectin antibodies, anti-bupleuran. (D) Labeling of the cell wall with the mAb, JIM7 specific for homogalacturonans. Note the abundance of well-preserved cortical microtubules. Arrows indicate labeling in Golgi cisternae and arrowheads indicate labeling in vesicles. Labeling was carried out on LRW- (B,C) or Spurr (A,D)-embedded samples. CW, cell wall; G, Golgi stacks; MT, microtubules. Bars = 0.1 μ m.

persed individual Golgi stacks and that the fusion protein was targeted to the Golgi apparatus. In addition, quantitative analysis of the binding pattern of GFP demonstrates that the β 1,2 xylosyltransferase involved in *N*-glycan processing is mostly located in medial cisternae of Golgi stacks in tobacco BY-2 cells (see also Pagny et al. 2003).

Discussion

Fixation Protocols and Ultrastructural Preservation

Many chemical fixation methods are currently used to prepare specimens for immunogold labeling of proteins at the EM level (Robinson et al. 1994; Frigerio et al. 2000; Nikus et al. 2001). They usually consist of

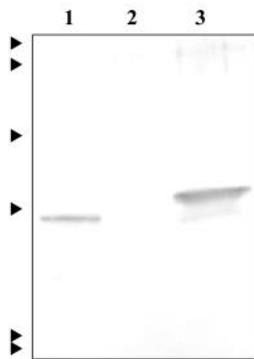


Figure 4 Specificity of anti-GFP antibodies. Commercial GFP (Lane 1) or cell proteins from wild-type (Lane 2) or transformed suspension-cultured tobacco BY-2 cells expressing the recombinant XylT36::GFP (Lane 3) were separated by SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose, and probed with the anti-GFP antibodies. Arrowheads at left indicate the position of the molecular mass markers (14, 18, 29, 43, 68, and 94 kD from bottom to top).

fixing samples with 4% (w/v) paraformaldehyde and 0.25–2% (w/v) glutaraldehyde eventually followed by a postfixation with 1% (w/v) osmium, before dehydration and embedding in LRW resin. When applied to tobacco BY-2 suspension-cultured cells, these protocols yield cells that are not structurally well preserved. In particular, important extractions of the ground cytoplasm and very poor preserved endomembranes, including Golgi stacks, were consistently observed. Therefore, the samples were not used further for immunogold labeling experiments with GFP. We therefore performed an uncommon process consisting of fixing tobacco cells in only a one-step using a mixture of glutaraldehyde and osmium (i.e., a co-fixation) at 4°C. A similar method, but including an additional post-osmication step, has been used to explore the ultrastructures of algae, fungi, stems and leaves of higher plants, and isolated subcellular fractions (Hayat 2000). Our modified method provided a good

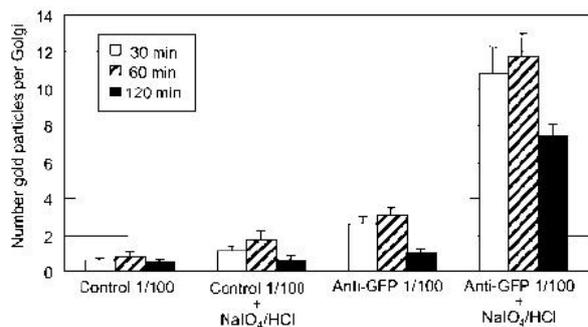


Figure 5 Histogram illustrating the labeling pattern of Golgi stacks with the anti-GFP antibodies in transformed suspension-cultured tobacco BY-2 cells at different times of fixation and with or without an etching treatment (NaIO₄/HCl). Anti-GFP labeling was carried out on LRW-embedded cells. Highly specific labeling of Golgi stacks is obtained after etching. Each histogram represents the mean of 30 values ± SEM. Control 1/100, rabbit preimmune serum used at a dilution of 1:100. Anti-GFP 1/100, polyclonal anti-GFP antibodies used at a dilution of 1:100.

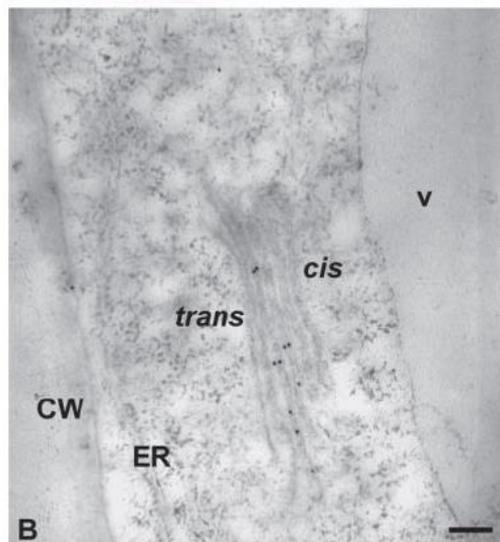
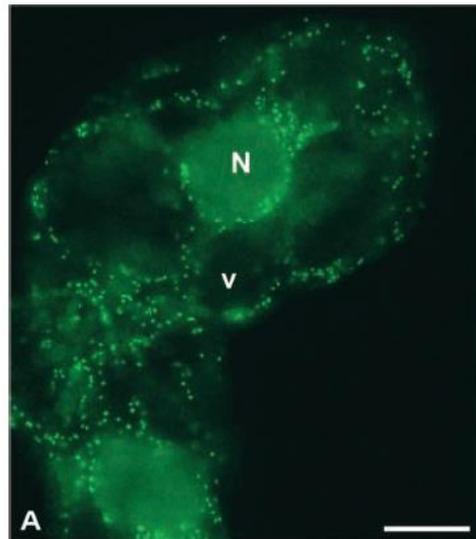


Figure 6 Distribution of XylT36::GFP in transgenic tobacco BY-2 suspension-cultured cells. (A) Golgi-associated GFP fluorescence. Golgi stacks are visible as bright fluorescent spots. (B) Electron micrograph illustrating typical immunogold labeling of Golgi stacks in transgenic cells with anti-GFP antibodies. Cells were fixed for 120 min and embedded in LRW resin. CW, cell wall; V, vacuole. Bars: A = 20 μm; B = 0.1 μm.

structural preservation of suspension-cultured tobacco BY-2 cells at all times of fixation (see Figure 1). In particular, Golgi stacks were well preserved and easily discernable. The quality of preservation of Golgi morphology did not match that obtained in high pressure-frozen tobacco BY-2 cells (Winicur et al. 1998; Nebenführ et al. 1999), but was in most cases better than obtained in tobacco BY-2 cells (Wee et al. 1998; Fitchette et al. 1999) or other plant cells, including

carrot suspension cultures, clover, and flax roots (Moore et al. 1991; Lynch and Staehelin 1992; Vicré et al. 1998) prepared by classical chemical methods. Golgi stacks were, however, less distinct in LRW-embedded cells than in Spurr-embedded samples, which is commonly observed for all plant and animal cells when LRW is used. The fixation time of 120 min was necessary in our conditions to obtain a sufficient preservation of LRW-embedded cells and discernable Golgi cisternae (Figure 2). It is worth noting that cortical microtubules, which are reputed to be difficult to preserve even with some cryomethods, were distinguishable in most cells. We discuss below that the method can be well exploited for immunogold localization of GFP within Golgi stacks.

Immunogold Labeling of Golgi-targeted GFP

We demonstrate that antibodies recognizing both carbohydrate epitopes and GFP bind to Golgi stacks of tobacco BY-2 cells prepared by the co-fixation method. First, immunogold labeling of cell matrix polysaccharides and complex *N*-glycans was possible and the quality of Golgi labeling with anti- β 1-2 xylose, anti-xyloglucan, and anti-pectin antibodies, did not differ from those previously observed in many plant cells either chemically or cryofixed (Moore et al. 1991; Lynch and Staehelin 1992; Zhang and Staehelin 1992; Driouich et al. 1993; Vicré et al. 1998). However, carbohydrate antigens are known to be less sensitive to fixative crosslinking than proteins, which probably facilitated polysaccharide antibody binding. Second, a specific GFP localization was also achieved in well-distinguishable Golgi stacks. As to immunocytochemical detection of proteins, it is known that glutaraldehyde crosslinks the amino groups of proteins and osmium causes conformational changes, thus reducing protein antigenicity. However, it has been reported that glutaraldehyde used alone is more effective in crosslinking proteins than when used in combination with osmium and that osmium induces deformation of protein structures when the specimen is prefixed with glutaraldehyde (Hayat 2000). Therefore, the use of the co-fixation could be more favorable to immunogold labeling of proteins than double classical fixation techniques. However, we did not check this statement in our case because no GFP labeling was done on the BY-2 cells fixed with the conventional procedure because of the very poor ultrastructural preservation. The binding of GFP antibodies to Golgi cisternae in co-fixed BY-2 cells was specific whatever the duration of fixation (Figure 5). However, this necessitates a treatment with NaIO₄ and HCl before immunolabeling, known to eliminate bound osmium (Craig and Goodchild 1984; Brorson 1998) and to reduce imine bonds between glutaraldehyde and proteins (Hayat 1970). The drawback of this

treatment is the potential loss of structural details of the membranes. In our conditions, this always resulted in a higher specific labeling, probably due to the unmasking of antigenic determinants and enhanced accessibility of the antibodies to GFP. It had, however, little influence on the ultrastructure and contrast of Golgi stacks, still allowing subtypes of Golgi cisternae and intra-Golgi distribution of gold particles to be discernable (see Figure 6). Although variability occurred from one experiment to another, the increase in GFP binding upon treatment was four- to sevenfold greater depending on the fixation time, and was even much higher than the non-specific binding of preimmune serum (see controls in Figure 5). The most significant binding with the least background (preimmune labeling) was obtained at a fixation time of 120 min, probably due to increased stabilization of GFP-tagged glycosyltransferase within Golgi structures.

The glycosyltransferase fused to GFP is a β 1,2 xylosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*, which is a type II membrane protein located, along with all other glycosyltransferases involved in *N*-glycan processing and complex polysaccharide synthesis, in Golgi membranes (Keegstra and Raikhel 2001). This enzyme is involved in the addition of β 1,2 xylose to *N*-linked glycoproteins within Golgi stacks of plant cells, an event shown to occur predominantly in medial cisternae (Lainé et al. 1991; Zhang and Staehelin 1992). In this study, we found that the β 1,2 xylosyltransferase was mainly confined to medial cisternae (see also Pagny et al. 2003), which is the same Golgi location of its products (i.e., β 1,2 xylose containing *N*-linked glycoproteins). This demonstrates that the enzyme acts preferentially in medial cisternae to add xylose residues onto *N*-glycoproteins and that glycosyltransferases involved in *N*-glycan processing are at least partially compartmentalized within Golgi stacks in plant cells.

In summary, we developed a simple co-fixation method of tobacco BY-2 suspension-cultured cells that provides a good preservation of cell ultrastructure while maintaining antigenicity of complex polysaccharides, *N*-glycans, and proteins of the Golgi membranes. We also show that the co-fixation method allows a specific localization of Golgi-targeted GFP using immunogold EM and NaIO₄/HCl etching treatment. Although the HPF/FS remains the best technique for such purposes, the chemical co-fixation and immunocytochemical methods described here can be easily used to study GFP-tagged plant proteins of the endomembrane system in laboratories for which specialized HPF equipment is not available.

Acknowledgments

Supported by the CNRS and the University of Rouen. We are grateful to Dr Anja Geitman (University of La-

val), to Dr Thomas Giddings (University of Colorado), and to John Moore (University of Cape Town) for helpful comments and critical reading of the manuscript. Thanks are also due to Laurence Chevalier and Jean Herbet for technical assistance and help at the Centre Commun de Microscopie Electronique (Rouen University).

Literature Cited

- Batoko H, Zheng HQ, Hawes C, Moore I (2000) A rab1 GTPase is required for transport between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus and for normal Golgi movement in plants. *Plant Cell* 12:2201–2217
- Boevink P, Oparka K, Santa Cruz S, Martin B, Betteridge A, Hawes C (1998) Stacks on tracks: the plant Golgi apparatus traffics on an actin/ER network. *Plant J* 15:441–447
- Brandizzi F, Frangne N, Marc-Martin S, Hawes C, Neuhaus JM, Paris N (2002a) The destination for single-pass membrane proteins is influenced markedly by the length of the hydrophobic domain. *Plant Cell* 14:1077–1092
- Brandizzi F, Fricker M, Hawes C (2002b) A greener world: the revolution in plant biomaging. *Mol Cell Biol* 3:520–530
- Bronson SH (1998) Antigen detection on resin sections and methods for improving the immunogold labeling by manipulating the resin. *Histol Histopathol* 13:275–281
- Carlemalm E, Garavito RM, Villiger W (1982) Resin development for electron microscopy and an analysis of embedding at low temperature. *J Microsc* 126:123–143
- Craig S, Goodchild DJ (1984) Periodate-acid treatment of sections permits on-grids immunogold localization of pea seed vicilin in ER and Golgi. *Protoplasma* 122:35–44
- Criqui MC, Weingartner M, Capron A, Parmentier Y, Shen WH, Heberle-Bors E, Bögre L, et al. (2001) Sub-cellular localization of GFP-tagged tobacco mitotic cyclins during the cycle and after spindle checkpoint activation. *Plant J* 28:569–581
- Driouich A, Faye L, Staehelin LA (1993) The plant Golgi apparatus: a factory for complex polysaccharides and glycoproteins. *Trends Biol Sci* 18:210–214
- Driouich A, Staehelin LA (1997) 7-dehydrobrefeldin A, a natural-occurring BFA derivative, inhibits secretion and causes a cis-to-trans breakdown of Golgi stacks in plants cells. *Plant Physiol* 113:487–492
- Faye L, Gomord V, Fitchette-Lainé AC, Chrispeels MJ (1993) Affinity purification of antibodies specific for Asn-linked glycans containing α 1,3 fucose or β 1,2 xylose. *Ana Biochem* 209:140–180
- Fitchette AC, Cabanes-Macheteau M, Marvin L, Martin B, Satiat-Jeuemaitre B, Gomord V, Crooks K, et al. (1999) Biosynthesis and immunolocalization of lewis a-containing N-glycans in the plant cell. *Plant Physiol* 121:333–343
- Frigerio L, Vine ND, Pedrazzini E, Hein MB, Wang F, Ma JKC, Vitale A (2000) Assembly, secretion, and vacuolar delivery of a hybrid immunoglobulin in plants. *Plant Physiol* 123:1483–1493
- Geelen DNV, Inzé DG (2001) A bright future for bright yellow-2 cell culture. *Plant Physiol* 127:1375–1379
- Gomord V, Denmat LA, Fitchette-Lainé AC, Satiat-Jeuemaitre B, Hawes C, Faye L (1997) The C-terminal HDEL sequence is sufficient for retention of secretory in the endoplasmic reticulum (ER) but promotes vacuolar targeting of proteins that escape the ER. *Plant J* 11:313–325
- Gomord V, Fitchette AC, Denmat LA, Michaud D, Faye L (1998) Production of foreign proteins in tobacco cell suspension culture. In Cunningham C, Porter AJR, eds. *Methods in Molecular Biotechnology*. Vol 3. Totowa, NJ, Humana Press, 155–164
- Granger CL, Cyr RJ (2000) Microtubule reorganization in tobacco BY-2 cells stably expressing GFP-MBD. *Planta* 210:502–509
- Hayat MA (1970) Polymerization. In *Principles and Techniques of Electron Microscopy*. New York, Van Nostrand Reinhold
- Hayat MA (2000) Chemical fixation. In *Principles and Techniques of Electron Microscopy*. Biological Applications. 4th ed. Cambridge, Cambridge University Press
- Höfgen R, Willmitzer L (1998) Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucleic Acid Res* 16:9877
- Keegstra K, Raikhel N (2001) Plant glycosyltransferases. *Cur Opin Plant Biol* 4:219–224
- Knox JP, Linstead PJ, King J, Cooper C, Roberts K (1990) Pectins esterification is spatially regulated both within cell walls and between developing tissues of root apices. *Planta* 181:512–521
- Kost B, Spielhofer P, Chua NH (1998) A GFP-mouse talin fusion protein labels plant actin filaments in vivo and visualizes the actin cytoskeleton in growing pollen tubes. *Plant J* 16:393–401
- Laemmli U (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T₄. *Nature* 227:680–685
- Lainé AC, Gomord V, Faye L (1991) Xylose-specific antibodies as markers of subcompartmentation of terminal glycosylation in the Golgi apparatus of sycamore cells. *FEBS Lett* 295:179–184
- Lynch M, Staehelin LA (1992) Domain-specific and cell-specific localization of two types of cell wall matrix polysaccharides in the clover root tip. *J Cell Biol* 118:467–479
- Moore PJ, Darvill AG, Albersheim P, Staehelin LA (1986) Immunogold localization of xyloglucan and rhamnogalacturonan 1 in the cell wall of suspension-cultured sycamore cells. *Plant Physiol* 82:787–794
- Moore PJ, Swords KMM, Lynch MA, Staehelin LA (1991) Spatial organization of the assembly pathway of glycoproteins and complex polysaccharides in the Golgi apparatus of plants. *J Cell Biol* 112:589–602
- Nebenführ A, Gallagher LA, Dunahay TG, Frohlick JA, Mazurkiewicz AM, Meehl JB, Staehelin LA (1999) Stop-and-go movements of plant Golgi stacks are mediated by the acto-myosin system. *Plant Physiol* 121:1127–1141
- Nikus J, Daniel G, Jonsson L (2001) Subcellular localization of beta-glucosidase in rye, maize and wheat seedlings. *Physiol Plant* 111:466–472
- Pagny S, Bouissonié F, Sarkar M, Follet-Gueye ML, Driouich A, Schachter H, Faye L, et al. (2003) Structural requirements for Arabidopsis β 1,2xylosyltransferase activity and targeting to the Golgi. *Plant J* 33:189–203
- Paupard MC, Miller A, Grant B, Hirsh D, Hall DH (2001) Immunogold localization of GFP-tagged *Yolk* proteins in *C. elegans* using microwave fixation. *J Histochem Cytochem* 49:949–956
- Quintana C (1994) Cryofixation, cryosubstitution, cryoembedding for ultrastructural, immunocytochemical and microanalytical studies. *Micron* 25:63–99
- Ritzenthaler C, Nebenführ A, Movafeghi A, Stussi-Garaud C, Behnia L, Staehelin LA, Robinson DG (2002) Reevaluation of the effects of brefeldin A on plant cells using tobacco Bright Yellow 2 cells expressing Golgi-tagged green fluorescent protein and COPI antisera. *Plant Cell* 14:237–261
- Robinson DL, Kahn ML, Vance CP (1994) Cellular localization of nodule-enhanced aspartate aminotransferase in *Medicago sativa* L. *Planta* 192:202–210
- Sakurai MH, Kiyohara H, Tsumuraya Y, Hashimoto Y, Yamada H (1998) Characterization of antigenic epitopes in anti-ulcer polysaccharides from *Bupleurum falcatum* L. using several carbohydrases. *Carbohydr Res* 311:219–229
- Staehelin LA, Giddings TH Jr, Kiss JZ, Sack FD (1990) Macromolecular differentiation of Golgi stacks in root tip of *Arabidopsis* and *Nicotiana* seedlings as visualized in high pressure frozen and freeze-substituted samples. *Protoplasma* 157:75–91
- Tokuyasu KT (1973) A technique for ultracytomicrotomy of cells suspensions and tissues. *J Cell Biol* 57:551–565
- Vicré M, Jauneau A, Knox JP, Driouich A (1998) Immunolocalization of β 1,4 and β 1,6-D-galactan epitopes in the cell wall and the Golgi stacks of developing flax root tissues. *Protoplasma* 203:26–34
- Wee EGT, Sherrier DJ, Prime TA, Dupree P (1998) Targeting of active sialyltransferase to the plant Golgi apparatus. *Plant Cell* 10:1759–1768

- Winicur ZM, Zhang GF, Staehelin LA (1998) Auxin deprivation induces synchronous Golgi differentiation in suspension-cultured tobacco BY-2 cells. *Plant Physiol* 117:501–513
- Zhang GF, Driouich A, Staehelin LA (1993) Effect of monensin on plant Golgi: re-examination of the monensin-induced changes in cisternal architecture and functional activities of the Golgi apparatus of sycamore suspension-cultured cells. *J Cell Sci* 104:819–831
- Zhang GF, Staehelin LA (1992) Functional compartmentalization of the Golgi apparatus of plant cells. An immunochemical analysis of high pressure frozen and freeze substituted sycamore maple suspension-cultured cells. *Plant Physiol* 99:1070–1083
- Zuo J, Niu QW, Wu Y, Kost B, Chua NH (2000) KORRIGAN, an Arabidopsis endo-1,4- β -glucanase, localizes to the cell plate by polarized targeting and is essential for cytokinesis. *Plant Cell* 12:1137–1152

Immuno-Glyco-Imaging in Plant Cells: Localization of Cell Wall Carbohydrate Epitopes and Their Biosynthesizing Enzymes

Marie-Laure Follet-Gueye et al.*

University of Rouen/Laboratoire « Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale »/UPRES EA 4358, Institut Fédératif de Recherche Multidisciplinaire sur les Peptides 23/Plate-forme de Recherche en Imagerie Cellulaire de Haute Normandie (PRIMACEN), Mont-Saint Aignan Cedex; France

1. Introduction

Plant cells are surrounded by a carbohydrate-rich compartment called the cell wall. This compartment plays a central role in growth, development, sexual reproduction and defence (Vicré et al., 2005; Mollet et al., 2007; Hématy et al., 2009; Seifert & Blaukopf, 2010). It is a carbohydrate-based structure composed mostly of polysaccharides (~90%) and glycoproteins (~10%). Polysaccharides include cellulose, pectin domains such as homogalacturonans (HG) with different levels of methylesterification, xylogalacturonan, rhamnogalacturonan-I (RG-I) and rhamnogalacturonan- II (RG-II) and hemicelluloses (depending on the species, xyloglucan [XyG] or arabinoxylan) (Liepman et al., 2010), whereas cell wall proteins are either enzymatic such as glucanases (Gilbert, 2010) or non-enzymatic such as arabinogalactan proteins (AGP) (Ellis et al., 2010, Driouich & Baskin, 2008).

Unlike cellulose microfibrils, complex polysaccharides (pectins and hemicelluloses) are assembled within the Golgi apparatus (GA) and are shuttled by GA-derived secretory vesicles to the cell wall (Driouich et al., 1993; Chevalier et al., 2010). The synthesis of these glycomolecules requires the action of a set of Golgi glycosyltransferases, in addition to nucleotide sugar transporters and nucleotide sugar interconversion enzymes (Sandhu et al., 2009).

* Mollet Jean-Claude¹, Vicré-Gibouin Maité¹, Bernard Sophie¹, Chevalier Laurence², Plancot Barbara¹, Dardelle Flavien¹, Ramdani Yasmina¹, Coimbra Silvia³ and Driouich Azeddine¹

¹ University of Rouen/Laboratoire « Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale »/UPRES EA 4358, Institut Fédératif de Recherche Multidisciplinaire sur les Peptides 23/Plate-forme de Recherche en Imagerie Cellulaire de Haute Normandie (PRIMACEN), Mont-Saint Aignan Cedex, France

² University of Rouen/UMR6634/CNRS, Institut des Matériaux/ Faculté des Sciences et Techniques, St Etienne du Rouvray Cedex, France

³ University of Porto/Departamento de Biologia/ Faculdade de Ciências/ Rua do Campo Alegre, Porto, Portugal

In this chapter, we describe a number of sample preparation and immunostaining procedures devoted to i) localization of cell wall heteropolysaccharides and proteoglycans within the cell wall domains and endomembrane system (Golgi stacks and associated vesicles) in various plant cell types and to ii) localization/mapping of Golgi-enzymes (glycosyltransferases) responsible for complex polysaccharide assembly within Golgi cisternae. We present procedures and examples of epitope localization using epifluorescence/confocal microscopy as well as immunogold electron microscopy.

2. Material

2.1 Plant materials

2.1.1 Arabidopsis and flax cultures

Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) and flax (*Linum usitatissimum*) seedlings were grown as described by Durand et al. (2009). Briefly, for root tip or border-like cell studies, seeds were surface sterilized with 35% (v/v) ethanol and with 35% (v/v) bleach. After several washes in sterile distilled water, the seeds were sown on agar-solidified nutrient medium (Baskin et al., 1992). Growth conditions were identical to those described by Vicré et al. (2005). Seeds were grown in vertically orientated square Petri dishes in 16-h-day/8-h-night cycles at 24°C for 7 to 15 days. For *Arabidopsis* pollen and pistil studies, seeds were spread on the surface of sterile soil and cultured in a growth chamber as described by Dardelle et al. (2010) and Coimbra et al., (2007). Pollen was collected and grown *in vitro* in a liquid medium in the dark at 22°C (Boavida & McCormick, 2007). The flowers were collected at different stages of pistil development, according to the stages of early flower development set by Smyth et al. (1990), starting at stage 8, up to stage 13, when buds open and anthesis occurs.

2.1.2 Tobacco suspension-cultured cells

Wild type or transformed suspension-cultured cells of *Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow 2 (BY-2) expressing Arabidopsis protein fused to the Green Fluorescent Protein (GFP) (Chevalier et al., 2010) were cultured in the Murashige and Skoog (MS) liquid medium. Cells were subcultured every week by transferring 10 ml of suspension cells in 150 ml of fresh medium.

2.2 Monoclonal antibodies

A set of monoclonal antibodies (MAb) directed against the carbohydrate moiety of cell wall polysaccharides (Table 1) such as xyloglucan (XyG) and pectin domains including homogalacturonan (HG), xylogalacturonan, and side chains of rhamnogalacturonan-I (RG-I) were used. In addition, the cell surface glycoproteins such as arabinogalactan proteins (AGP) were localized with four MAbs (JIM8, JIM13, LM2 and MAC207).

2.3 Microscopes

For fluorescence studies, samples were examined using a confocal laser-scanning microscope (Leica TCS SP2 AOBS). Tetramethylrhodamine-5-(and 6)-isothiocyanate (TRITC) and Fluorescein isothiocyanate (FITC) fluorescences were imaged using an excitation wavelength of 543 nm or 488 nm, with the emission wavelength at 565–585 nm or 500–600

MAb	Epitope recognized	Polymer	References
CCRC-M1	α -Fuc-(1,2)- β -Gal	FucogalactoXyG	Puhlmann et al., (1994)
CCRC-M86	unknown	XyG	Pattathil et al., (2010)
JIM5	MeGalA-(1,4)- [(GalA) ₄ -(1,4)- MeGalA	Weakly methylesterified HG	Clausen et al., (2003)
JIM7	GalA-(1,4)- [(MeGalA) ₄ -(1,4)- GalA	methylesterified HG	Clausen et al., (2003)
JIM8	unknown	AGP	Pennell et al., (1991)
LM2	β -linked GlcA	AGP	Yates et al., (1996)
LM5	[(1-4)- β -D-Gal] _{>3}	Galactan of RG-I	Jones et al., (1997)
LM6	[(1-5)- α -L-Ara] _{5/6}	Arabinan of RG-I	Willats et al., (1998)
LM8	unknown	Xylogalacturonan	Willats et al., (2004)
LM13	linear (1-5)- α -L- arabinan	RG-I	Moller et al., (2008)
LM15	XXXG	XyG	Marcus et al., (2008)
MAC207	β -GlcA-(1,3)- α -GalA- (1,2)-Rha	AGP	Yates et al., (1996)

Table 1. List of monoclonal antibodies directed against cell wall carbohydrate epitopes used in this report. Fuc, fucose; Gal, galactose; MeGalA, 6-O-methyl-galacturonic acid; GalA, galacturonic acid; GlcA, glucuronic acid; Ara, arabinose; Rha, rhamnose. AGP, arabinogalactan protein; HG, homogalacturonan; MAb, monoclonal antibody; RG-I, rhamnogalacturonan-I; XyG, xyloglucan. For more information see www.ccruc.uga.edu/~mao/wallMAb/Antibodies/antib and www.plantprobes.net

nm, respectively. Arabidopsis pollen tubes and pistils were observed under fluorescence illumination on a Leica DLMB microscope or a Zeiss Axio Imager Z1 inverted epifluorescence microscope equipped with FITC (absorption, 485–520 nm; emission, 520–560 nm wavelength) or filter UV filter (365/445 nm) for callose and β -glucan detection with aniline blue and calcofluor white, respectively. Images were acquired with a Leica DFC300FX camera or an AxioCam MR in automatic exposure mode, and processed with Axiovision 4.4 software.

For immunogold observations, grids were observed with a transmission electron microscope (TEM) apparatus (Tecnai 12 Bio-Twin; Philips) at 80 kV and images were acquired with an Erlangshen ES500W camera.

For all samples, control experiments were performed by omission of the primary antibody.

3. Spatial distribution of non cellulosic polysaccharides and proteoglycans in the cell wall and endomembrane compartments by fluorescence microscopy

These immunostaining methods were applied to various cell types including flax root cap and associated border-like cells, arabidopsis pollen tube or female sporophyte and tobacco suspension-cultured cells.

3.1 Cell surface immunostaining

Cell surface imaging was carried out in order to have an overview of plant cell wall composition. While the plant surface is the first structure involved during various biotic or abiotic stresses, the plant surface tissues are also implicated in plant growth and development. Therefore information on the composition of cell wall is important and can be obtained by immunocytochemistry and Fourier transform infrared microspectroscopy (Durand et al., 2009). We describe below several protocols dedicated to polysaccharides immuno-detection and cytochemical localization at the cell surface of flax root border-like cells (BLC), *Arabidopsis* pollen tube and pistil.

3.1.1 Root border-like cells

Root tips of most plant species produce a large number of cells programmed to separate from the root cap and to be released into the external environment named the border cells (Hawes et al., 2003). As described in Brassicaceae family plants (Driouich et al., 2007), flax doesn't produce isolated border cells but it does produce and release cells that remain attached to each other, forming a block of several cell layers called border-like cells (Vicré et al., 2005). We investigate the role of cell wall pectins in cell attachment and the organization of border-like cells in flax.

BLC from 5 days-old flax seedlings were put down gently on the clean surface of 10 wells glass slides (teflon printed diagnostic slide, Fischer Scientific). BLC were then fixed for 1 hour in 4% (w/v) paraformaldehyde (PAF) and 1% (v/v) glutaraldehyde in 50 mM piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic) acid buffer (PIPES), pH 7, and 1 mM CaCl₂ (adapted from Willats et al., 2001). BLC were washed in 50 mM PIPES, 1 mM CaCl₂, pH 7, and incubated for 30 min in a blocking solution of 3% (w/v) low-fat dried milk in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2. After being carefully rinsed in PBS containing 0.05% (v/v) Tween 20 (PBST), BLC were incubated overnight at 4°C with the primary antibody (LM8 dilution 1:5 in 0.1% [v/v] PBST; Willats et al., 2004). After five washes with 0.05% PBST, roots were incubated with the secondary antibody, goat IgG anti-rat FITC conjugated (dilution 1:50 in 0.1% PBST) for 1 h at 37°C in the dark. BLC were rinsed in 0.05% PBST, mounted in anti-fade solution (Citifluor AF2; Agar Scientific). Between each immunostaining step, incubation medium was cautiously removed with filter paper to prevent the loss of BLC.

Labelling with the MAb LM8 specific for xylogalacturonan occurred in the outer surface of the border-like cells (Fig. 1). These results are similar to those already obtained for *Arabidopsis* (Vicré et al., 2005; Durand et al., 2009) that have revealed the importance of pectins in the organization of BLC.

3.1.2 *Arabidopsis* pollen tubes

Pollen tubes are fast growing tip-polarized cells carrying the two sperm cells. After landing on compatible stigmatic cells, pollen germinates and the tube grows deep inside the pistil, penetrating different tissues following guidance cues from both the sporophytic tissues and from the female gametophyte to arrive precisely at the micropylar end of the ovule and deliver sperm. Pollen grains can germinate *in vitro* and produce pollen tubes in liquid and on solid media (Fig. 2A). *Arabidopsis* pollen tubes are small (5 µm diameter) but can reach over 1mm long.

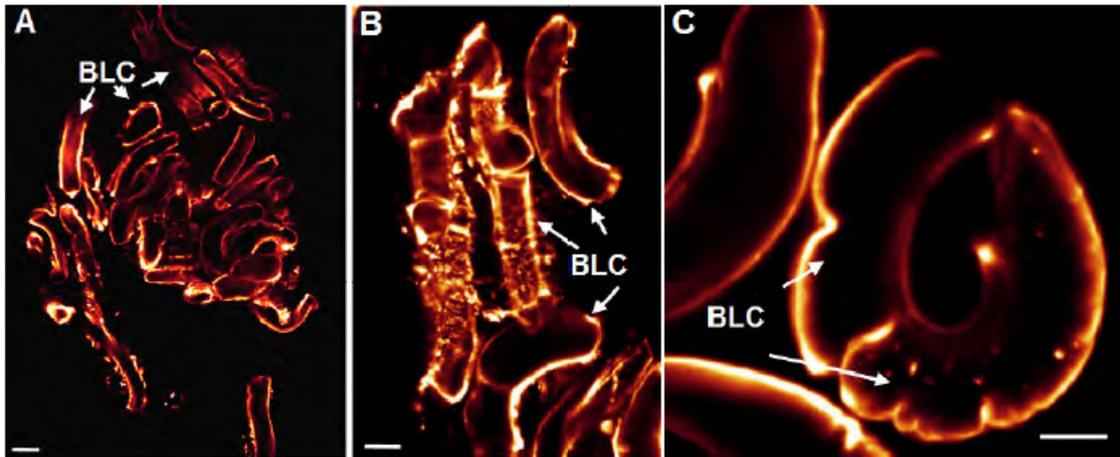


Fig. 1. Immunofluorescence labelling of flax root border-like cells (BLC) with the MAb LMS specific for xylogalacturonan. Bars = 20 μ m.

Pollen tubes grown in liquid germination medium were mixed (v/v) with a fixation medium containing 100 mM PIPES buffer, pH 6.9, 4 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 4 mM ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA), 10% (w/v) Suc, and 5% (w/v) PAF and incubated for 90 min at room temperature. Pollen tubes were rinsed three times by centrifugation with 50 mM PIPES buffer, pH 6.9, 2 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, and 2 mM EGTA and three times with phosphate-buffered saline (100 mM potassium phosphate, 138 mM NaCl, and 2.7 mM KCl, pH 7.4) supplemented or not with 3% fat-free milk. Primary antibodies were diluted at 1:5 or 1:10 as described previously (Mollet et al., 2000) with PBS (with or without 3% milk). Pollen tubes were rinsed with the buffer and incubated overnight at 4°C in the dark with the secondary antibody combined with FITC (Sigma) diluted at 1:50 with the appropriate buffer for 3 h at 30°C. For JIM, LM, and MAC antibody detection, goat anti-rat IgG (whole molecule)-FITC was used; for CCRC antibody detection, sheep anti-mouse IgG (whole molecule)-FITC was used.

Arabidopsis pollen tubes display specific cell wall organization with a strong detection of epitopes associated with arabinogalactan proteins in the tip region (Fig. 2B-C) as observed in other species such as lily (Mollet et al., 2002) or tobacco (Li et al., 1992). Moreover, pectic domains such as the the arabinan side chains of RG-I (Fig. 2D-E) and methylesterified HGs (Fig. 2F) are also present in the cell wall of the pollen tubes. The cell surface immunolabeling gives important information on the accessibility of the epitopes. The enzyme or chemical treatments of the sample can sometimes be informative on the presence or not of a set of epitopes. As observed in Arabidopsis pollen tube, lily pollen tube was strongly labelled at the tip with the MAb directed against AGPs. Removal of the pectin with 0.1% pectinase extended the labelling for AGP to the entire pollen tube cell wall (Jauh & Lord, 1996).

In Arabidopsis, the female sporophyte is composed of a stigma with papillae, the receptive surface of the pollen grains, a short style and the ovary containing the ovules (Fig. 3B). Within the style and ovary, the pollen tubes grow in a specialized tissue, the transmitting tract guided toward the ovules.

Pollen tubes can also be observed *in vivo* (i.e. within the female tissues) by staining callose, a specific polysaccharide found in the intine wall of the pollen grain and pollen tube cell wall

and within the pollen tube as callose plugs deposited periodically by the vegetative cell to maintain the expanding cell in the tip region (Fig. 3D-E). This method is widely used to assess the pollen tube growth between wild type pollen and mutant. Pollinated pistils were fixed with a mixture of acetic acid: ethanol (1:3 vol/vol) at least 12h. Rinsed 5 times in water, the pistils were softened by incubation with 8M NaOH for 12h at room temperature. The pistil were rinsed 5 times with water, placed on a glass slide and stained with 0.1% buffered decolorized aniline blue, pH 11 according to Johnson-Brousseau & McCormick (2004) for 4h and observed.

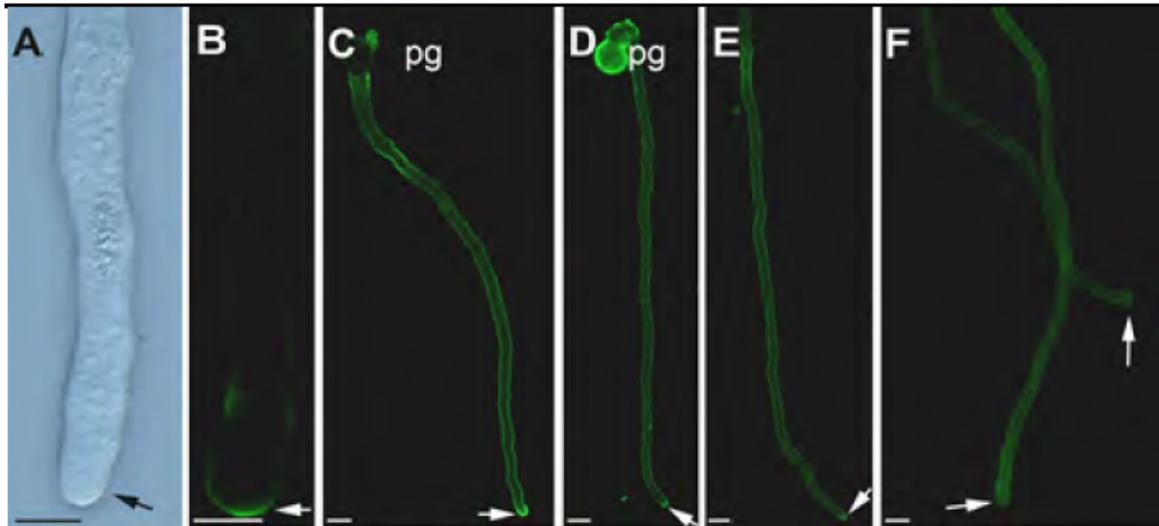


Fig. 2. Cell surface immunolocalization of cell wall epitopes in *Arabidopsis thaliana* pollen tube. A. Transmitted light of 6h-old *in vitro* grown pollen tubes, B-C. Localization of AGP epitopes at the tip of the pollen tubes using MAC207 and LM2 MAbs, respectively. D-E. Localization of arabinan epitopes found in the pectic polysaccharide RG-I in the entire pollen tube cell wall using LM6 and LM13 MAbs, respectively. F. Localization of highly methylesterified HG epitopes using JIM7 MAb. Arrow, pollen tube tip; pg, pollen grain. Bars = 5 μ m.

After pollination, pollen grains germinate on the stigma and produce pollen tubes that grow within the cell wall of the papillae and in the transmitting tract of the style and ovary. Pollen grains are clearly detected on the stigma surface and the pollen tubes in the transmitting tract of the style and the ovary (Fig. 3D). Callose plugs are also visible. With higher magnification, the pollen tubes were observed in the ovary, emerging from the transmitting tract, growing on the funiculus toward the micropyle of the ovules (Fig. 3E).

3.2 Immunostaining of cell wall components on sections

The localization of cell wall polymers on sections is very instructive in particular to identify specific labelling of a given cell or tissue. When possible, the use of embedding medium is often avoided in order to increase the sugar epitope accessibility (Willats et al., 2001; Harholt et al., 2006). However, given the small sizes of *Arabidopsis* root tip, pollen tube or pistil, it is impossible to prepare hand sections. We currently use a procedure including fixation, dehydration and embedding to perform the sectioning step. We use methylmetacrylate

(Baskin, 1992) or London Resin White (LR White) resins as embedding media which do not disturb the detection of polysaccharides.

Pistils and anthers were fixed either with 4% PAF and 1% glutaraldehyde in 50 mM PIPES pH 7 for 2h or with 2% PAF and 2.5% glutaraldehyde in phosphate buffer (0.025 M, pH 7, with one micro drop of Tween 80), placed under vacuum for 1 h and then at 4 °C overnight. After dehydration in a graded ethanol series, the material was embedded in methylmetacrylate (Fig. 3A-C) or LR White (Fig. 3F-I). Sections (2 to 5 µm) were obtained with the Leica Reichart Supernova or EM UC6 microtome and placed on coated glass slides. Cytochemical staining with 0.05% toluidine blue showed that the cell wall of the transmitting tract cells is enriched in acidic polymers such as HG (Fig. 3B). The immunolocalization was performed as described in Coimbra et al., (2007) and Lehner al., (2010). Slides can be further counterstained with calcofluor white (fluorescent brightener; Sigma) for β-glucans (e.g., cellulose) detection as shown in Fig. 3F-I.

The arabinan epitopes associated with RG-I are strongly labelled in the style but very weakly in the cell wall of the papillae in the stigma (Fig. 3A). Weakly methylesterified HGs are also present in the cell wall of the ovary cells including the transmitting tract tissue (Fig. 3C). Glycosylated proteins, such as AGP, prevail in many stigma exudates, style transmitting tissues and pollen itself, and are believed to provide recognition signals and directional guidance for the pollen tube (Cheung et al., 1995; Wu et al., 2001). AGP represent a large group of highly glycosylated cell surface proteins, many of which contain glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchors. They are suggested to act in signalling as soluble signals or as modulators and co-receptors of apoplastic morphogens. These immunolocalization studies, have shown a specific labelling of the central transmitting tissue of the style and also of the tracheary elements present all over the ovary, with MAbs JIM8 and JIM13 (Fig. 3F).

At the beginning of ovule development, when sections of *Arabidopsis* ovules were treated with MAbs JIM8 or JIM13, the specific labelling of the entire megaspore surface was striking. This labelling was specific to the first cell with a haploid constitution, marking the beginning of the gametophytic generation (Coimbra et al., 2007). As the development continues, the labelling with the same two MAbs was observed in the embryo sac wall, and was particularly intense in the synergid cells and in their filiform apparatus (Fig. 3H). At this more advanced stage of development, the labelling obtained with JIM8 and JIM13 extended to the integument micropylar cells and to the micropylar nucellus (Fig. 3H). The prevalence of AGPs in these reproductive tissues along with their possible role in signalling makes them excellent candidate molecules involved in guided pollen tube growth. This type of labelling was also shown for *Nicotiana tabacum* (Qin & Zhao, 2006) for *Amaranthus hypochondriacus* (Coimbra & Salema, 1997) and for *Actinidia deliciosa* (Coimbra & Duarte, 2003). The labelling obtained with the MAbs MAC207 and LM2, was found to be extensive and scattered throughout most cell types as shown in the style (Fig. 3G) and in the ovule, although excluded from the embryo sac (Fig. 3I).

The results obtained with this immunolabeling work were important not only from a developmental point of view, but also because they lay down the basis for the characterization of the expression of individual AGP genes in each of the developmental stages considered. As shown with cell surface labelling, removal of pectic polymers by enzymes (pectate lyase) or chemical treatments of the sections can effectively unmask other

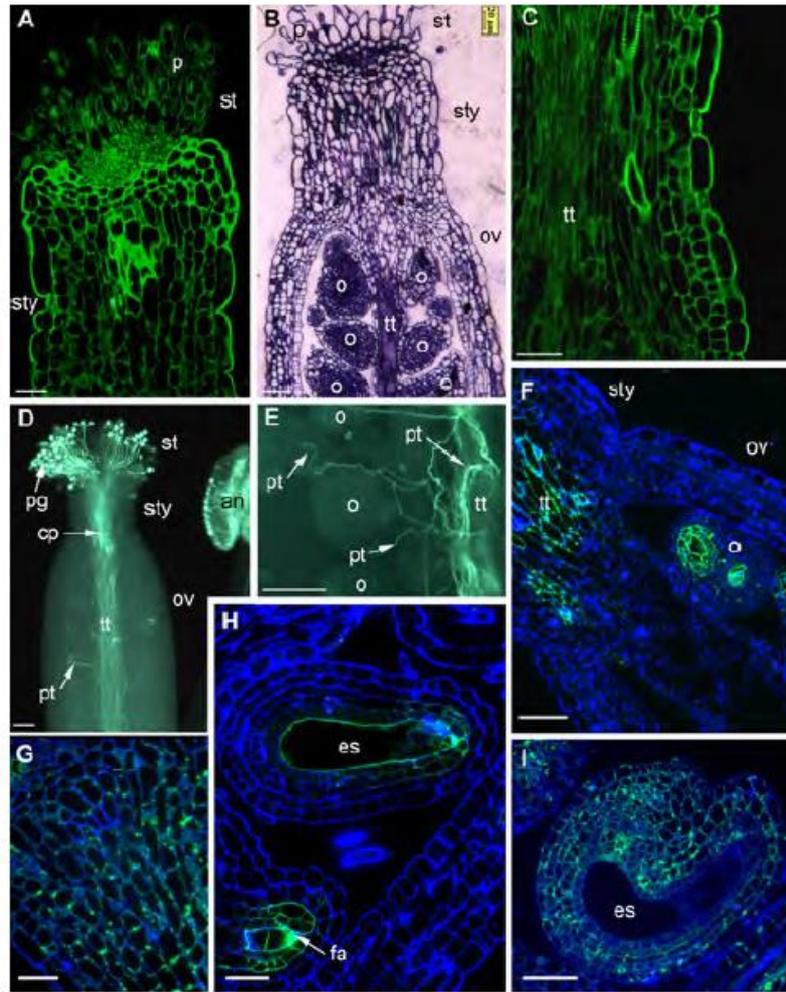


Fig. 3. Cytochemical staining and immunolocalization of cell wall epitopes in *Arabidopsis thaliana* pistil. A. Immunolocalization using the LM6 MAb specific for arabinan epitopes associated with RG-I in the cell wall of the stigma, style and ovary. B. Cytochemical staining of sectioned pistil with toluidine blue showing the acidic cell wall polysaccharides including the HG. C. Immunolocalization using the JIM5 MAb of epitopes associated with weakly methylesterified HG in the epidermal layer of the ovary and in the transmitting tract tissue. D-E. Cytochemical staining of callose with decolorized aniline blue on whole mount softened pollinated pistil showing the strong fluorescence of the pollen grains on the stigma surface, the pollen tube cell wall and the callose plugs within the female transmitting tissue in the style and ovary. E. A close up of D shows the pollen tubes emerging from the transmitting tract directed toward the ovules for the release of the sperm cells. F. The labelling with JIM8 is present in the centrally located transmitting tissue of the style, in the ovules embryo sac wall and extends into the integument micropylar cells. G. LM2 labelling all the style cells. H. The specific labelling by JIM8 of the embryo sac wall, the filiform apparatus and micropylar integuments are evident. I. This well developed ovule is showing all cell walls labelled by LM2, except the embryo sac cells and wall. an, anther; cp, callose plug; es, embryo sac; fa, filiform apparatus; o, ovule; ov, ovary; p, papillae; pg pollen grain; pt, pollen tube; st, stigma; Sty, style; tt, transmitting tract. Bars = 20 μ m.

cell wall epitopes such those found on XyG as shown on tobacco stem sections by Marcus et al., (2008) and recently reviewed by Lee et al., (2011).

3.3 Immunostaining of cell wall polymers within the endomembrane compartment using protoplast

In higher plants, the endomembrane system and more precisely the Golgi apparatus plays a major role in the synthesis of the cell wall (Staelin et al., 1990; Driouich et al., 1993). Involvement of plant Golgi stacks in the cell wall biosynthesis was revealed by cytochemical staining (Harris & Northcote, 1971) and biochemical experiments after fractionation (Ray, 1980; Gibeaut & Carpita, 1994). Hemicellulosic and pectic polymers are synthesized in the endomembrane system before their final assembly and deposition into the cell wall. Tobacco suspension-cultured cells (*Nicotiana tabacum*, Bright yellow-2 cells) are widely used in the study of endomembrane system (Pagny et al., 2003; Follet-Gueye et al., 2003; Toyooka et al., 2009; Langhans et al., 2011). Immunolabeling of N-glycan epitopes associated with Golgi membranes was easily achieved after a slight cell wall permeabilization (Fitchette et al., 1999). Here, we show that the production of protoplasts is necessary for performing immunodetection of cell wall polymer precursors in Golgi stacks.

3.3.1 Cell permeabilization and protoplast preparation

For tobacco cells immunolabeling, in 1.5 ml ependorf vials, four-day-old BY-2 cells (300 μ l) were fixed with 800 μ l of 4% PAF in PBS (PBS: 8 g L⁻¹ NaCl, 0.29 g L⁻¹ KCl, 1.45 g L⁻¹ Na₂HPO₄, 0.24 g L⁻¹ KH₂PO₄) for 1 h at room temperature. After six washes for 5 min with PBS buffer, fixed tobacco cells were incubated 30 min in 1 ml enzymatic mixture of 1% cellulase (Sigma) and 1% pectinase (Sigma) diluted in PBS buffer. Cells were then washed four times in PBS. For the protoplast preparation, four-day-old BY-2 cells (400 μ l) were put in 1.5 ml ependorf vials, and plasmolyzed in 800 μ l plasmolysis medium (20 mM MES buffer pH 5.6; 0.6 M mannitol; 0.5 mM CaCl₂; 0.25 mM MgCl₂) for 15–20 min. Then the cell wall was digested overnight at 25°C by incubation in 1 ml enzymatic mixture of 1% cellulase (Sigma) and 1% pectinase (Sigma) diluted in plasmolysis medium containing 0.1% bovine serum albumin (BSA). After three washes with plasmolysis medium, protoplasts were fixed 1 h with 4% PAF in PBS at room temperature. Then protoplasts were washed four times with PBS. Then, 25 μ l of cells or protoplasts were squashed onto 1:10 poly-L-Lysine (sigma) coated 10 wells slides (Fischer Scientific) and air dried.

3.3.2 Immunostaining

Protoplasts and tobacco cells were sequentially incubated 10 min with 0.5% Triton X100 in PBS, with 1% BSA and 3% half-milk in PBS, and washed three times with 3% BSA in PBS. Samples were incubated overnight at 4°C, with the primary antibody CCRC-M86 diluted at 1/10 in PBS containing 1% BSA, 3% normal goat serum (NGS). After six washes in PBS containing 1% BSA, samples were incubated 1 h at 25°C with a secondary antibody (goat IgG anti-rat TRITC conjugate from Sigma) diluted at 1/50 in PBS containing 1% BSA, 3% NGS. Finally cells or protoplasts were washed three times in PBS containing 1% BSA.

When the cell wall is only partially digested (Fig. 4A), the density of XyG epitope remaining in the cell wall limits the MAbs penetration inside the cell. So even under confocal

microscopy observations, labelling of Golgi units is hardly detectable. In contrast, the complete removal of the cell wall in protoplasts allows the access of the MAb CCRC-M86 to the Golgi-associated epitopes (Fig. 4B). Moreover, it is well recognized that cell wall polymer synthesis is stimulated in protoplasts thus contributing to the increase of labelling of the endomembranes. With this procedure, we have clearly shown that sugar motifs associated with XyG (Fig. 4) or pectins (data not shown) are present in the Golgi units. These are numerous and dispersed throughout the cytoplasm (see numerous fluorescent spots on Fig. 4B).

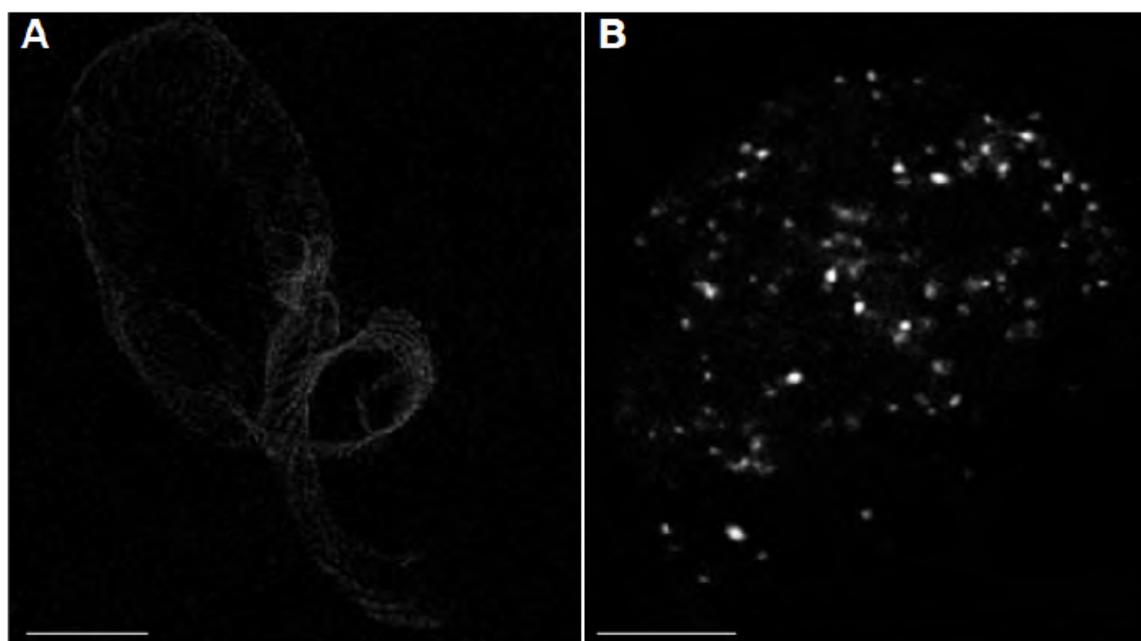


Fig. 4. Immunocytochemical localization of XyG epitopes in partially-digested tobacco BY-2 suspension-cultured cells and protoplasts with the MAb CCRC-M86. A- Confocal microscope images showing fluorescent staining of the cell surface and B- Golgi bodies. CCRC-M86 epitopes localize to both the cell wall and Golgi stacks of tobacco cell or protoplasts, respectively. Bars = 8 μm .

4. Spatial organization of non-cellulosic cell wall polysaccharides at the ultrastructural level

Due to the inability to subfractionate the plant Golgi stacks into *cis*, medial and *trans* cisternae, our knowledge, concerning the assembly of complex polysaccharides within the Golgi subcompartments, remains scarce. Progress towards the understanding of compartmentalization of matrix cell wall polysaccharide biosynthesis has come from immuno-electron microscopical analyses (Staehelin et al., 1990, Zhang & Staehelin, 1992; Driouich et al., 1993). These immunolabeling studies have been performed on samples prepared by HPF, a cryofixation technique that provides excellent preservation of Golgi stacks thereby allowing different cisternal subtypes to be easily distinguished. For ultrastructural and immunocytochemical investigations, we used the HPF coupled to freeze substitution (FS) technologies to prepare *Arabidopsis* root tips and pollen tubes, or tobacco

suspension-cultured cells. We present and discuss here protocols allowing epitopes detection associated with polysaccharides and membrane proteins (e.g., glycosyltransferases responsible for polysaccharide biosynthesis).

4.1 TEM sample preparation

4.1.1 High-Pressure Freezing/Freeze Substitution (HPF/FS)

4.1.1.1 Pre-cooling treatment

Prior to freezing, 3 day-old tobacco (BY-2) suspension-cultured cells were concentrated on 50 μm nylon membrane and incubated successively in MS + 5% glycerol, then in MS+10% glycerol for 1h each, at +4°C and under light stirring. Cells were then transferred to MS+20% glycerol and immediately frozen (see § 4.1.1.2). Root tips of seven day-old arabidopsis seedlings were first immersed in 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES) buffer (20mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2mM, KCl 2mM, Sucrose 0.2M; pH 5.5) containing a small drop of red ruthenium (to allow visualisation of the roots) for 5 min. Roots were then incubated with 0.2M sucrose in MES buffer for 5 min before freezing. Six hour-old pollen tubes were kept in the germination medium (GM) before freezing.

4.1.1.2 High pressure freezing

High-pressure freezing was performed with the freezer HPF-EM PACT I Leica-microsystems (Studer et al., 2001). Tobacco cells were concentrated on 50 μm nylon membrane and transferred into the cavity of a copper ring used for cryofracture which is 100 μm in depth and 1.2 mm in diameter. Excess medium was lightly absorbed with filter paper. Using a horizontal loading station, the specimen carriers were tightened securely into the pod of specimen holder. After fixation on the loading device, specimens were frozen according to a maximum cooling rate of 13000°C/s, incoming pressure of 7.5 bars and working pressure of 4.8 bars. Rings containing frozen samples were stored in liquid nitrogen until the freeze substitution procedure was initiated.

Root tips of *Arabidopsis thaliana* (1 to 2 mm) were excised with a fine razor blade in freezing media (0.2M sucrose in MES buffer). Three or four roots were placed in a gold platelet (200 mm in depth and 1.2 mm in diameter) carrier pre-filled with the freezing medium and coated with soybean lecithin (100 mg mL⁻¹ in chloroform). Specimens were immediately frozen in the EM PACT freezer under similar conditions of pressure and cooling rate as for the tobacco cells (see above). Time between excision of the root tips and freezing was <1 min.

Like root tips, centrifuged 6-h-old pollen tubes were transferred into the cavity of gold cupules coated with soybean lecithin (100 mg mL⁻¹ in chloroform). Excess medium was removed using a filter paper and were frozen as describe above.

4.1.1.3 Freeze substitution and resin embedding

After HPF, pollen tubes were transferred to a freeze substitution automate (EM-AFS; Leica) precooled to -140°C. Freeze substitution conditions followed a modified procedure from D. Studer (personal communication). Substitution media were composed of 2% osmium in anhydrous acetone. Samples were substituted at -90°C for 72 h. The temperature was gradually raised (2°C h⁻¹) to -60°C and stabilized during 12 h, then gradually raised (2°C⁻¹)

to -30°C (12 h) and gradually raised again (2°C h⁻¹) to 0°C for 2 h. Samples were washed at room temperature with fresh anhydrous acetone. Infiltration was done at +4°C in acetone-Spurr resin (2:1, 1:1, 1:2, 8 h each step) and with pure resin for at least 2 days. Polymerization was performed at 60°C for 16 h. Samples destined for protein immunocytochemistry (Arabidopsis root tips and BY-2 cells) were substituted in anhydrous acetone + 0.5% uranyl acetate (UA) using similar program as that described above except that the final substitution step was performed at -15°C. Samples were rinsed twice with anhydrous ethanol. Infiltration was processed at -15°C in a solution containing Ethanol : LR White (ratio 2:1; 1:1; 1:2, 8h each step) and with pure resin for 2x24 h. Polymerisation was performed into the AFS apparatus at -15°C under ultra violet light for 48h. Using an ultracut EM-UC6 (Leica), thin sections (90 nm) were mounted on formvar-coated nickel grids.

4.2 Immunogold staining

4.2.1 Single immunogold labelling

4.2.1.1 Cell wall immunogold labeling on epoxy sections

Grids, with pollen tube sections, were rehydrated in a Tris-buffered saline buffer (TBS) + 0.2% BSA and blocked in a TBS/BSA 0.2%/milk 3% solution for 30 min. After three brief rinses in TBS/BSA 0.2% solution, grids were incubated 3 h at 25°C in primary antibodies: non diluted for LM15 and CCRC-M1 or diluted (LM6, 1:2; anti-callose, 1:100) in TBS/BSA 0.2% buffer. Then, grids were washed (six times for 5 min each) in TBS/BSA 0.2% and incubated for 1 h at 25°C in a 1:20 secondary antibody (goat anti-rat for LM6 and LM15, goat anti-mouse for CCRC-M1 and anti-callose) conjugated to 10-nm gold particles (British Biocell International). Finally, grids were washed (six times for 5 min each) in a TBS + BSA 0.2% buffer, 1 min in TBS, 10 min in TBS + glutaraldehyde 2%, 5 min in TBS, and then two times for 5 min each in double deionized water. The sections were stained with 0.5% (w/v) UA in methanol for 10 min in the dark, rapidly rinsed 10 times with water and stained with lead citrate for 10 min, and briefly rinsed 10 times with water. In this experiment, epoxy resin was used as embedding medium. It is generally well admitted that Epoxy resin, which allow good cellular structure preservation, is not recommended for immunocytochemical studies. In the case of XyG and callose epitopes studied in Arabidopsis pollen grain and pollen tube, the detection was done with success (Fig. 5). Subcellular observation of Arabidopsis pollen grains showed that the intine cell wall contains the hemicellulose epitopes associated with fucogalactoXyG (Fig. 5A) and XyG (Fig. 5B). On the exine wall, pollen coat material is also visible. In the pollen tube, a double cell wall can be detected back from the tip region with the inner cell wall containing callose (Fig. 5C).

4.2.1.2 Immunogold labeling of polysaccharides and synthesizing-enzymes in Golgi stacks on acrylic sections

Ultrathin sections of tobacco cells or Arabidopsis root tips were blocked in TBS (Tris-buffered saline: Tris-HCl 20 mM pH 7.2, 200 mM NaCl) supplemented with 0.2% of BSA and milk 3% for 30 min. Sections were then incubated with monoclonal antibodies CCRC-M86 at a 1/5 dilution in TBS + BSA and normal goat serum (NGS; British Biocell International) for 3 h at room temperature. After washing in TBS + BSA 0.2% buffer, grids were incubated for 1 h at room temperature in the rat secondary antibody conjugated to 10-nm gold particles (Tebu-British Biocell International, <http://www.tebu-bio.com>). After

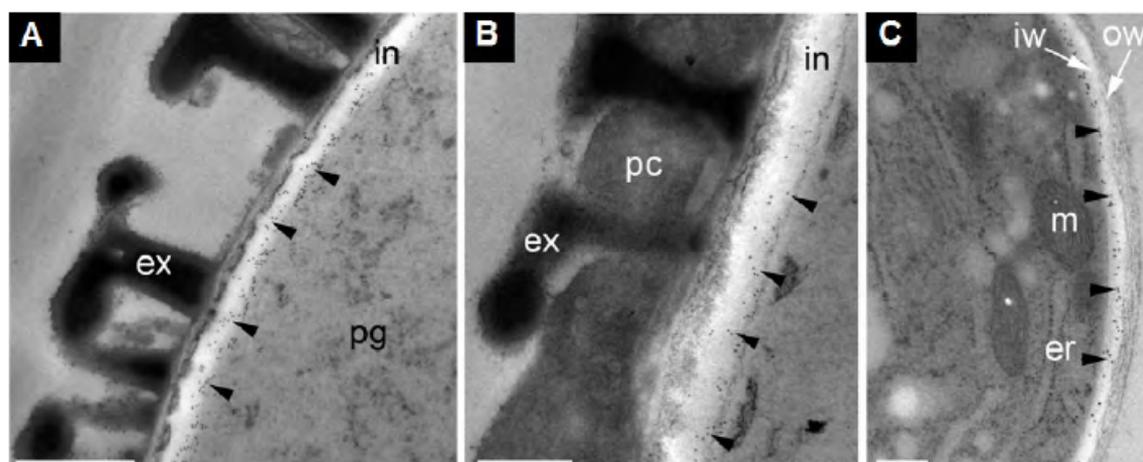


Fig. 5. A. Localization of fucosylated XyG in the intine wall of the pollen grain using the CCRC-M1 MAbs. B. Localization of the motif XXXG found in XyG in the intine wall of the pollen grain using the LM15 MAbs. C. Localization of callose in the inner cell wall of the pollen tube using the anti-callose antibody. Arrowhead, gold particles; er, endoplasmic reticulum; ex, exine; in, intine; iw, inner cell wall; m, mitochondria; ow, outer cell wall; pc, pollen coat; pg, pollen grain. Bars = 0.2 μ m.

washing and fixation in TBS + 2% glutaraldehyde, sections were first stained with 4% vapour osmium for 3 h on a hotplate warmed to 40°C placed under a fume hood. For this step, the grids were put closed to 4% osmium droplets on a parafilm paper. This system was put in a small glass Petri dish who was kept hermetically closed until the total osmium evaporation. Then sections were classically stained 10 min with 0.5% UA diluted in methanol and 10 min in lead citrate.

Ultrathin sections of frozen cells expressing AtXT1-Green Fluorescent GFP (GFP) or AtMURUS 3 (MUR3)-GFP fusion proteins (Chevalier et al., 2010) were blocked in TBS (Tris-HCl 20 mM pH 7.2, 200 mM NaCl) supplemented with 0.2% of BSA and Tween 20 0.05% for 15 min. Sections were then incubated with the polyclonal anti-GFP antibody (BD living colors A.v peptide antibody - Clontech) at a 1/5 dilution in TBS + BSA and NGS for 2 h at room temperature. After washing in TBS + BSA 0.2% buffer, grids were incubated for 1 h at room temperature in the rabbit secondary antibody conjugated to 10 nm gold particles (Tebu-British Biocell International). After washing and fixation in TBS + 2% GA, sections were stained as described above with osmium vapours, uranyl acetate and lead citrate.

The combined use of HPF-FS and cryo-embedding in acrylic resin is particularly adapted to immunodetection of either membrane proteins or cell wall polysaccharides (Fig. 6 & Fig. 7). The cryo-immobilisation by HPF ensures the sample vitrification without modification of molecular structures. While chemical fixatives (such as aldehydes or osmium tetroxyde) are relatively inert with sugar molecules, proteins are often covalently cross linked with fixatives, which can disturb the epitope structure. During the cryo-dehydration step, we have lightly fixed the cells by adding 0.5% uranyl acetate to avoid the modification of the protein epitope. To enhance the electron micrograph contrast, the contact with osmium vapour prior to classical uranyl acetate and lead citrate staining is efficient (Fig. 6, Fig. 7, Fig.8 & 9) to enhance Golgi stack morphology. The non-fucosylated sugar motifs associated

with XyG, already detected in Golgi units in tobacco protoplasts (Fig. 4B), are mainly localized to the secretory vesicles of *trans* Golgi network (TGN) (Fig. 6A). With the same preparation procedure, it is also possible to immunolocalize XyG-synthesizing enzymes fused to GFP (e.g., AtXT1-GFP), within Golgi cisternae in transformed BY-2 cells (Fig. 6B). AtXT1-GFP was shown to localize mainly to the *cis* Golgi compartment (Chevalier et al., 2010).

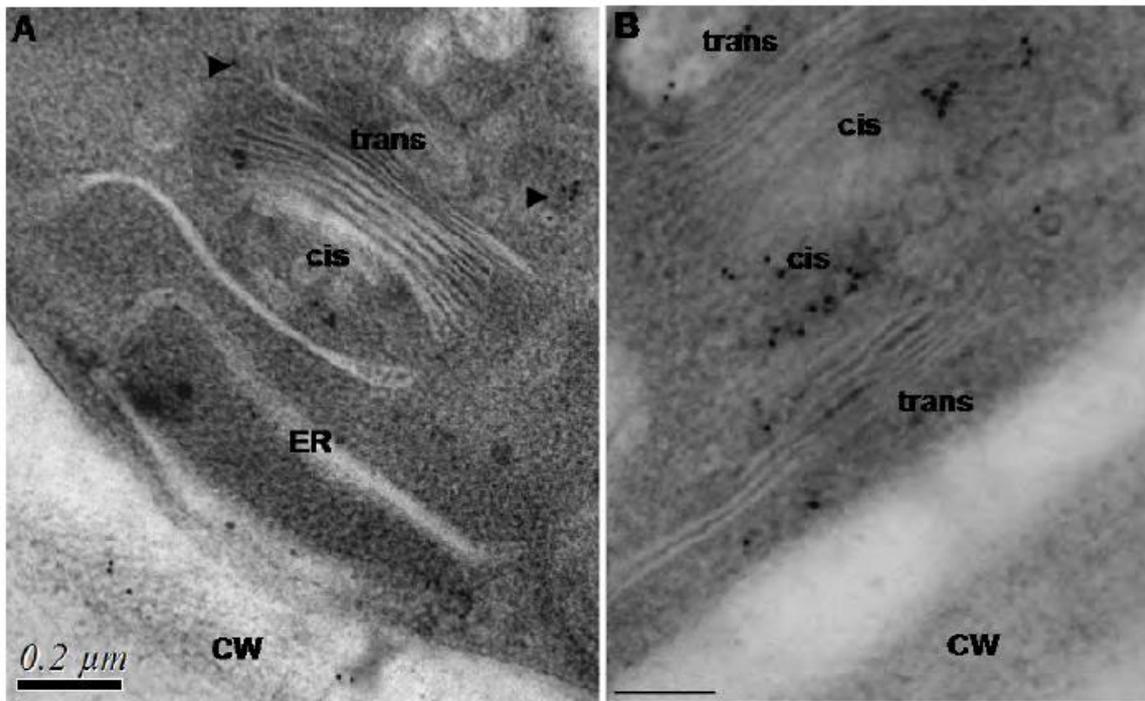


Fig. 6. Electron micrographs of HPF/FS and LR White embedded tobacco cells illustrating immunogold labelling of Golgi stacks and the cell wall. A- Non fucosylated motifs of XyG were immunodetected with the MAb CCRC-M86. B- AtXT1-GFP fusion protein was labelled with anti-GFP Ab, in Golgi stacks of transformed tobacco BY-2 suspension-cultured cells. The black head arrows indicate the secretory vesicles labelled. CW, cell wall; ER, endoplasmic reticulum; bars = 200 nm.

4.2.2 Double immunogold labeling

Information on the distribution of Golgi localized enzymes are currently obtained by using GFP technologies and confocal laser microscopy (Brandizzi et al., 2004). Immuno-electron microscopy is the only approach to study the distribution of GFP-labelling within a given organelle. Therefore, a central issue for immunogold at TEM level is to preserve epitopes of interest while minimizing the loss of ultrastructural details. Here, we study the localization of QUASIMODO2 protein (QUA2) in *qua2* mutant transgenic plants expressing the QUA2-GFP fusion protein (Mouille et al., 2007). QUA2 is a putative methyltransferase involved in the methylesterification of HG. It is well admitted that HG are synthesized in their methylesterified form and then possibly de-esterified by pectin methyltransferases in the cell wall (Micheli, 2001).

With the sample substituted in 0.5% AU medium and embedded in LR White resin, we have been able to perform a double immunolabeling to localize Golgi enzymes fused to GFP and cell-wall polysaccharides. Ultrathin sections of Arabidopsis root tips of *qua2-QUA2-GFP* (Mouille et al., 2007) were blocked as describe above and incubated 2h at 25°C with the polyclonal anti-GFP antibody (BD living colors A.v peptide antibody - Clontech) at a 1/5 dilution in TBS + BSA and normal goat serum. After washing in TBS + BSA 0.2% buffer, sections were again saturated with 3% milk, 0.2% BSA in TBS buffer for 30 min. Incubation with the MAb JIM7 diluted to 1/5 in TBS + BSA and normal goat serum was done for 2h at 25°C. After six rinsing for 5 min with TBS buffer containing 0.2% BSA, grids were incubated for 1 h at room temperature in the rabbit secondary antibody conjugated to 10 nm gold particles diluted to 1/20 in TBS + BSA 0.2% + NGS 3%. Sections were then washed three times in TBS buffer + BSA 0.2%, and incubated 1 h at 25°C in the goat anti-rat secondary antibodies conjugated to 20-nm gold particles (Tebu-British Biocell International, <http://www.tebu-bio.com>). Sections were rinsed six times for 5 min with TBS buffer containing BSA 0.2%, and were followed by one washing in TBS buffer. After fixation in TBS + 2% GA, sections were stained as described above with osmium vapours, uranyl acetate and lead citrate.

The fusion protein is detected in the *trans* Golgi cisternae (Fig. 7C) while the methylesterified HG are immunolocalized not only in the *trans* cisternae but also in the TGN as previously described (Zhang & Steahelin, 1992; Toyooka et al., 2009). The lack of strong fixative in the substitution medium like osmium tetroxide or glutaraldehyde, allows the combined detection of pectic epitopes and its Golgi-associated biosynthetic enzyme. The cell wall labelling of the methylesterified HG epitopes (Fig. 7A & 7B) shows that the sample preparation did not alter the polymer localization. Given that the protein epitope is not impaired by strong fixatives, the double labelling of the product (HG) and the Golgi-localized methyltransferase is now possible. Our results suggest that HG methylation is likely to start in *trans* Golgi cisternae.

4.3 Quantitative mapping of polysaccharide-synthesizing enzymes within Golgi stacks

Statistical analysis of immunogold labelling was used to map XyG-glycosyltransferases within Golgi cisternae (Chevalier et al., 2010). As no antibodies directed against these enzymes are currently available, we have chosen to investigate their localization indirectly by using anti-GFP antibodies in transgenic tobacco cells expressing the glycosyltransferases fused to GFP. Immunogold labelling was quantified over each Golgi cisternae (fifty Golgi stacks with distinguishable cisternal subtypes) and subjected to chi-squared (χ^2) test to check for labelling specificity in transformed BY-2 cells versus wild type. The relative labelling index (RLI) was also determined to evaluate specific gold particles distribution within different subtypes of Golgi cisternae (Mayhew et al., 2002; Mayhew, 2011).

4.3.1 Labelling specificity of signal in transformed BY-2 cells

To evaluate the distribution of gold particles in Golgi stacks of transformed cells as compared with wild type cells, we used a chi-squared test (χ^2) as described by Mayhew et al., (2002). We considered the null hypothesis as 'no difference of gold distribution between wild type and transformed cells'. We analyzed gold labelling in different compartments of Golgi stacks: *cis*, medial, *trans* and the TGN (Fig. 8).

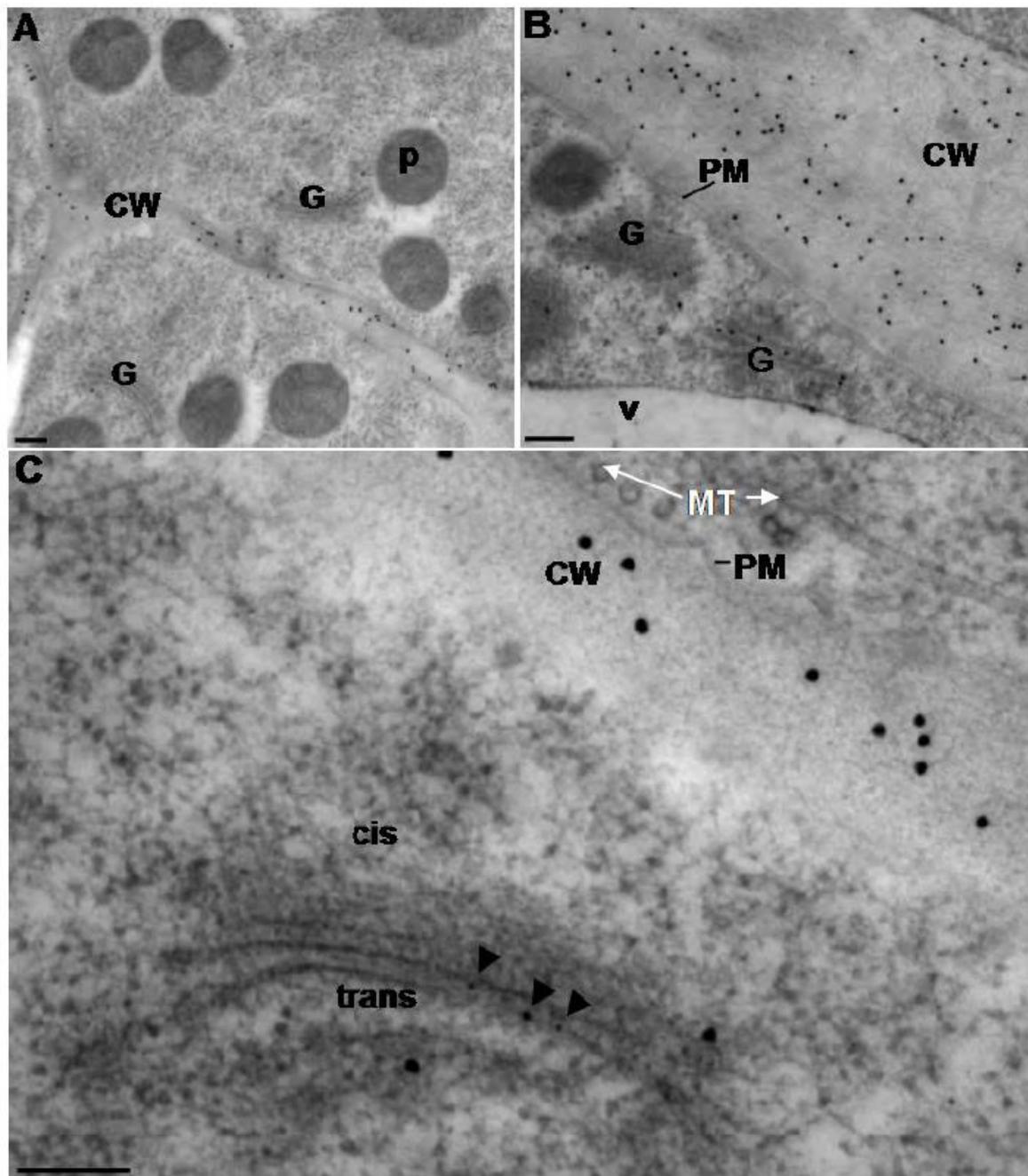


Fig. 7. Electron micrographs of HPF/FS and LR White-embedded ultrathin sections of Arabidopsis root tips of *qua2-QUA2-GFP*. Double localization of AtQUA2-GFP with anti-GFP antibody (10 nm gold particles) and of highly methylesterified HG with MAb JIM7 (20 nm gold particles) in Arabidopsis root meristematic cells. A-B: Note abundant labelling of HG epitopes in the cell wall and in the last Golgi compartments. C, the black arrow heads indicate the 10 nm gold particles corresponding to GFP labelling in the *trans* Golgi cisternae. CW, cell wall; G, Golgi; MT, cortical microtubules; P, plastid; PM, plasma membrane; V, vacuole. Bars = 100 nm.

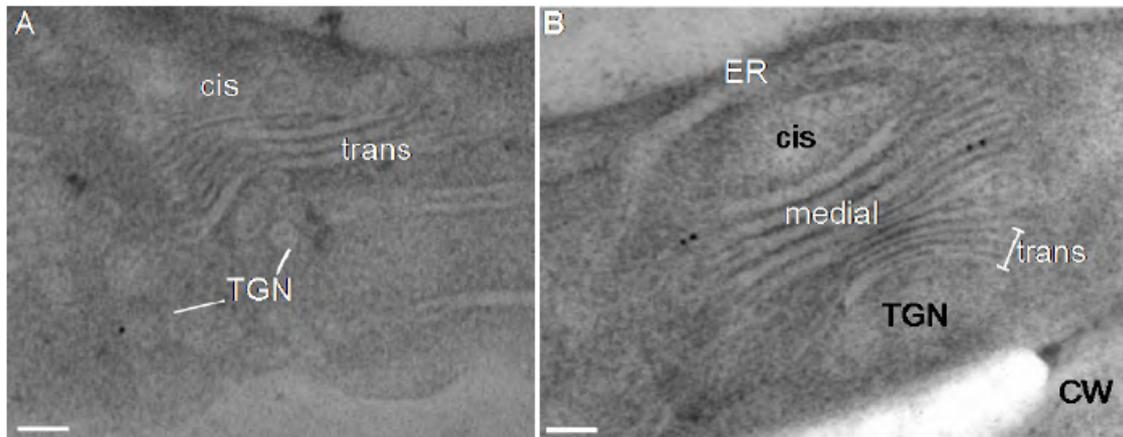


Fig. 8. Electron micrographs of GFP immunodetection on A- 3 day-old wild type BY-2 cells or B- transformed cells expressing the fusion protein AtMUR3-GFP. 50 similar images are used to determine the number of gold particles observed in each Golgi compartment: *cis*, *medial*, *trans* cisternae and the *trans* Golgi network (TGN). CW, cell wall; ER, Endoplasmic reticulum; At MUR3 is a XyG-galactosyltransferase, bars = 100 nm.

To compare the distribution of gold particles in these compartments between the two tobacco lines, we counted the gold particles observed over 50 Golgi units both in non-transformed cells (Wild type cells, termed WT cells) and transformed tobacco cells (expressing Golgi-enzyme fused to GFP, termed GFP-cells), immunolabelled with anti-GFP antibodies (Fig. 8). We prepared a table of gold particles counted for each tobacco lines and their repartition in different Golgi compartments (Table 2).

For each Golgi compartment, we calculated the expected gold particle number (E_{ij}) according to the null hypothesis as 'no difference of gold distribution between wild type and transformed cells and that the gold particles are randomly distributed across the Golgi units'. The expected gold count (E_{ij}) at two line cells for each selected Golgi compartment are calculated by using the table 2 values¹, from the product of column (total gold particles observed in all Golgi stacks for wild type or transformed tobacco lines) and row totals (total gold particles observed in all BY-2 lines for the selected compartment) divided by the big total (total gold particles observed in four Golgi compartments, in wild type and transformed BY-2 cells).

	<i>cis</i> (j_1)	<i>medial</i> (j_2)	<i>trans</i> (j_3)	TGN (j_4)	Row Total (j_5)
WT cells (i_1)	O_{11}	O_{12}	O_{13}	O_{14}	O_{15}
GFP cells (i_2)	O_{21}	O_{22}	O_{23}	O_{24}	O_{25}
Column Total (i_3)	O_{31}	O_{32}	O_{33}	O_{34}	O_{35}

Table 2. Gold particles counted (O_{ij}) over 50 Golgi stacks from Wild type tobacco cells (WT cells) or transformed BY-2 cells by Golgi localized enzymes fused to GFP (GFP cells). O_{ij} designates the gold particle number indicated in the row (i) and the column (j). O_{15} and O_{25} designate the total gold particle number in WT cells and GFP cells, respectively. O_{31} to O_{34} correspond to the total gold count in the four Golgi compartments of the two tobacco lines. O_{35} is the big total (four Golgi compartments, in WT and GFP cells).

Example for the *cis* compartment of WT cells, expected gold number (E_{11}) is calculated as described below¹:

$$E_{11} = [(O_{31} \times O_{15}) / O_{35}] \quad (1)$$

To compare the distribution of gold particles between the two tobacco lines in these compartments, we created a contingency table (two columns; four rows) as described in Mayhew et al. (2002) and also in table 3. In this contingency table we report the observed (O_{ij}) and expected (E_{ij}) numbers of gold particles. For each tobacco line, total column should be equal ($O_{15}=E_{15}$; $O_{25}=E_{25}$). If expected number is superior to 5, the χ^2 test can then be applied. The corresponding partial χ^2 value is calculated as the square of the difference between observed and expected gold particle numbers divided by the expected gold number.

Example for the *cis* compartment of WT cells, χ^2 value (χ_{11}^2) is calculated as described below²:

$$\chi_{11}^2 = [(O_{11} - E_{11})^2 / E_{11}] \quad (2)$$

The total χ^2 value ($\chi_{15}^2 + \chi_{25}^2$) is compared with χ^2 value in contingency table analysis with a degree of freedom equal to 3 in our experiment and corresponding to³:

$$\text{Degree of freedom} = [(\text{row number} - 1) \times (\text{column number} - 1)] \quad (3)$$

When the total χ^2 value ($\chi_{15}^2 + \chi_{25}^2$) is found to be superior to that of the contingency table, $\chi_{\text{table}}^2 = 12.38$ (with a degree of freedom of 3 and an uncertainty degree $\alpha = 0.005$) indicating that labelling is specific in Golgi stacks of transformed BY-2 cells.

	WT cells			GFP cells			Total observed gold
	(O _{ij})	(E _{ij})	χ_{ij}^2	(O _{ij})	(E _{ij})	χ_{ij}^2	
<i>cis</i>	O ₁₁	E ₁₁	χ_{11}^2	O ₂₁	E ₂₁	χ_{21}^2	O ₃₁
<i>medial</i>	O ₁₂	E ₁₂	χ_{12}^2	O ₂₂	E ₂₂	χ_{22}^2	O ₃₂
<i>trans</i>	O ₁₃	E ₁₃	χ_{13}^2	O ₂₃	E ₂₃	χ_{23}^2	O ₃₃
TGN	O ₁₄	E ₁₄	χ_{14}^2	O ₂₄	E ₂₄	χ_{24}^2	O ₃₄
Column Total	O ₁₅	E ₁₅	χ_{15}^2	O ₂₅	E ₂₅	χ_{25}^2	O ₃₅

Table 3. Model of contingency table use for quantitative analysis of anti-GFP labelling over Golgi stacks in tobacco BY-2 cells expressing Golgi enzyme-GFP. This table contains two columns (O_{ij} and E_{ij}) and four rows (related to the four Golgi compartments studied).

4.3.2 Determination of fusion protein distribution in Golgi stacks

Quantification of the labelling was done according to Mayhew et al. (2002), on a total of 50 Golgi stacks with clearly distinguishable subtypes of cisternae (Fig. 9A) from transformed BY-2 cells expressing enzyme-GFP fused construct (noted GFP cells). First, gold particles were counted in each Golgi compartment (*cis*, *medial*, *trans* and the TGN) in 50 Golgi stacks from WT or GFP cells as described in § 4.3.1. The 'observed gold particles' (n_o) in a given Golgi compartment in GFP cells is determined by subtracting the number of gold particles found in this compartment (O_{ij}, GFP cells, 50 Golgi stacks) from the one counted in WT cells (O_{ij},

WT)⁴. Example for the *cis* compartment of WT cells, n_0 value is determined as described below⁴:

$$n_{011} = O_{21} - O_{11} \quad (4)$$

Second, each electron micrograph is calibrated and a lattice of test points was superimposed on each Golgi stack (so as to be random in position) by the plungins function of Image J computer software (Fig. 9B); hit points were counted ('Observed points', P) in each compartment of the Golgi stack.

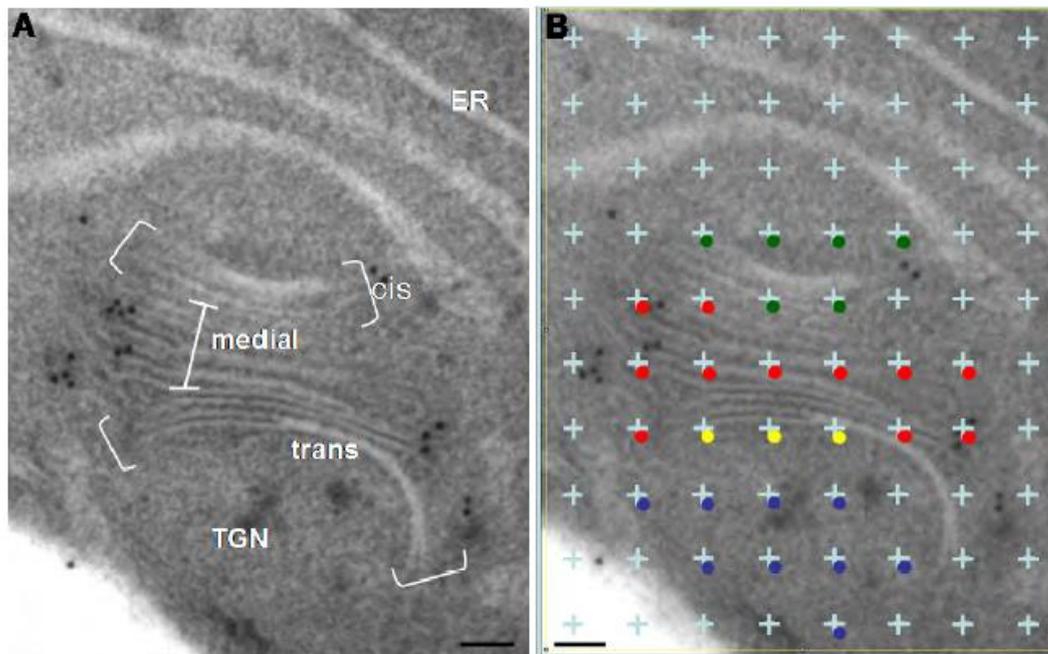


Fig. 9. Electron micrograph of a Golgi unit from At-MUR3-GFP transformed BY-2 cells. (A) *cis*, medial, *trans* and *trans* Golgi network (TGN) are clearly distinguishable. (B) Lattice (1015,43 area per point) was superimposed on the same electron micrograph calibrated (1nm/1.01 pixels) by using Image J computer software. In this example, 6 'Observed points, P' are present in the *cis* (green points), 11 in the medial (red points), 3 in the *trans* (yellow points) and 9 in the TGN (blue points) compartments. Scale bars = 100 nm.

"Observed gold particles, n_0 " and "observed points, P" are put in the relative labelling index (RLI) table (Table 4). Then, the 'expected golds particles' (n_e) (i.e. random distribution) is calculated for each Golgi compartment⁵ from the product of the observed points in the Golgi compartments and column total of observed gold particles (total gold particles observed in four Golgi compartments, n_{051}), divided by the column total of observed points (total points observed in four Golgi compartments, P_{52}). Example for the *cis* compartment of WT cells, n_e value is determined as described⁵:

$$n_{e13} = (P_{12} \times n_{051}) / P_{52} \quad (5)$$

Observed (n_0) and expected (n_e) gold particles distribution allowed calculation of the relative labelling index⁶ (RLI):

$$RLI = (n_0/n_e) \quad (6)$$

For a random distribution, the relative labelling index (RLI) is inferior or equal to 1, and for a compartment preferentially labelled RLI is superior to 1.

	Observed gold particles (n_0)	Observed points (P)	Expected gold particles (n_e)	RLI (n_0/n_e)
<i>cis</i>	$n_{0\ 11}$	P_{12}	$n_{e\ 13}$	$n_{0\ 11}/ n_{e\ 13}$
medial	$n_{0\ 21}$	P_{22}	$n_{e\ 23}$	$n_{0\ 21}/ n_{e\ 23}$
<i>trans</i>	$n_{0\ 31}$	P_{32}	$n_{e\ 33}$	$n_{0\ 31}/ n_{e\ 33}$
TGN	$n_{0\ 41}$	P_{42}	$n_{e\ 43}$	$n_{0\ 41}/ n_{e\ 43}$
Column total	$n_{0\ 51}$	P_{52}	$n_{e\ 53}$	

Table 4. Model of relative labelling index (RLI) table comprising 3 columns (n_0 , P and n_e) and four rows (related to four Golgi compartments studied). Total observed gold particles and total of expected gold particles must be equal ($n_{0\ 51} = n_{e\ 53}$).

In a recent published study, we have applied this quantitative analysis to determine the Golgi mapping of three XyG synthesis enzymes in transformed tobacco cell lines (Chevalier et al., 2010). We show that the labelling of AtXT1-GFP (Fig. 6B) was mostly associated with *cis* and medial cisternae, whereas the labelling of AtMUR3-GFP (Fig. 8B & Fig.9) was mainly detected in medial and *trans* cisternae of Golgi stacks. In addition to HPF-FS protocol described here for BY-2 cell preparation, Tokuyasu cryo-sectioning approach is also amenable to this plant cell model (Chevalier et al., 2011). A new approach named the "rehydration method" was proposed by Van Donselaar et al. (2007). It combines HPF/Fs procedure followed by a rehydration step, infiltration in sucrose and cryo-sectioning, and is particularly efficient to investigate the localization of epitopes from polysaccharides that are often lost during Tokuyasu process and was recently used to immunolocalize epitopes associated with XyG (Viotti et al., 2010). It could be of interest to adapt the rehydration method to plant suspension cells like tobacco BY-2 cells for quantitative study of cell wall polymers such as hemicelluloses or pectins.

5. Conclusion

In conclusion, many immuno-microscopical methods are available to investigate plant cell walls. A number of antibodies against cell wall carbohydrate epitopes are also available and can be used to examine the distribution of polysaccharides. It is however important to perform experiments with varying parameters to determine the best conditions for a given sample. Optical imaging instrumentation, based on confocal laser scanning microscopy (CLSM), offers the ability to determine the spatial organisation of polymers at the cell surface, across the cell wall compartment as well as within the endomembrane system. The CLSM minimizes interference of innate plant autofluorescence from chlorophylls or vacuole content and provides a quite precise picture of polysaccharides distribution. Moreover, cryo-sample preparation for immunogold EM studies has significantly improved the immunodetection at the subcellular level of the cell wall components and their synthesizing enzymes. Finally, the preservation quality of both the cell ultrastructure and epitopes allows the quantification of the labelling within specific membrane-bound compartments (e.g; Golgi stacks). A careful

combination of microscopical and quantification methodologies is very promising for future studies devoted to imaging of cell wall glycomolecules and synthesizing enzymes.

6. Acknowledgments

Work in authors laboratories is/was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), l'Université de Rouen, le Conseil Régional de Haute Normandie, the Plant Research Network VATA of Haute Normandie, the French ministry of Research and the FCT (Fundação para a Ciência e Tecnologia, Portugal) within the project PTDC/AGR-GPL/67971/2006.

7. References

- Baskin T.I., Busby C.H., Fowke L.C., Saturant 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*, Vol. 187, pp. 405-413
- Boavida, L.C. & McCormick, S. (2007) Temperature as a determinant factor for increased and reproducible in vitro pollen germination in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, Vol.52, pp. 570-582
- Brandizzi F., Irons S.L., Johansen J., Kotzer A. & Neumann U. (2004) GFP is the way to glow: Bioimaging of the plantendomembrane system. *Journal of Microscopy*, Vol. 214, pp.: 138-158.
- Cheung, A.Y., Wang, H. & Wu, H.M. (1995) A floral transmitting tissue-specific glycoprotein attracts pollen tubes and stimulates their growth. *Cell*, Vol.82, pp. 383-393
- Chevalier, L., Bernard, S., Ramdani, Y., Lamour, R., Bardor, M., Lerouge, P., Follet-Gueye, M.L. & Driouich, A. (2010) Subcompartment localization of the side chain xyloglucan-synthesizing enzymes within Golgi stacks of tobacco suspension-cultured cells. *The Plant Journal*, Vol.64, pp. 977-989
- Chevalier L., Bernard S., Vitré-Gibouin M., Driouich A. & Follet-Gueye M.L. (2011) Cryopreparation of tobacco Bright Yellow-2 (BY-2) suspensioncultured cells and application to immunogold localization of Green Fluorescent Protein-tagged-membrane-proteins. *Journal of Biological Research*, Vol.16, pp. 202-216
- Clausen, M.H., Willats, W.G.T. & Knox, J.P. (2003) Synthetic methyl hexagalacturonate hapten inhibitors of anti-homogalacturonan monoclonal antibodies LM7, JIM5 and JIM7. *Carbohydrate Research*, Vol.338, pp. 1797-1800
- Coimbra, S. & Salema, R. (1997). Immunolocalization of arabinogalactan proteins in *Amaranthus hypochondriacus* L. ovules. *Protoplasma*, Vol.199, pp. 75-82.
- Coimbra, S. & Duarte, C. (2003). Arabinogalactan proteins may facilitate the movement of pollen tubes from the stigma to the ovules in *Actinidia deliciosa* and *Amaranthus hypochondriacus*. *Euphytica*, Vol.133, pp. 171-178
- Coimbra, S., Almeida, J., Junqueira, V., Costa, M.L. & Pereira, L.G. (2007) Arabinogalactan proteins as molecular markers in *Arabidopsis thaliana* sexual reproduction. *Journal of Experimental Botany*, Vol.58, pp. 4027-4035
- Dardelle, F., Lehner, A., Ramdani, Y., Bardor, M., Lerouge, P., Driouich, A. & Mollet JC (2010) Biochemical and immunocytological characterizations of *Arabidopsis thaliana* pollen tube cell wall. *Plant Physiology*, Vol.153, pp. 1563-1576
- Driouich A., Faye L. & Staehelin L.A. (1993) The plant Golgi apparatus: a factory for complex polysaccharides and glycoproteins. *Trends in Biochemistry. Science.*, Vol. 18, pp. 210-214

- Driouich A., Durand C. & Vicié-Gibouin M. (2007) Formation and separation of root border cells. *Trends in Plant Science*, Vol. 12, pp.14-19
- Driouich A. & Baskin T. (2008). Intercourse between cell wall and cytoplasm exemplified by arabinogalactan-proteins and cortical microtubules in the root of *Arabidopsis thaliana*. *Am. J. Botany*, 95: 1491-1497.
- Durand C., Vicié-Gibouin M., Follet-Gueye M.L., 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 Physiology*, Vol.3, pp 1411-1421
- Ellis, M., Egelund, J., Schultz, C.J. & Bacic, A. (2010) Arabinogalactan-proteins: key regulators at the cell surface? *Plant Physiology*, Vol.153, pp. 403-419
- Fitchette A.C., Cabanes-Macheteau M., Marvin L., Martin B., Satiat-Jeunemaitre B., Gomord V., Crooks K., Lerouge P., Faye L. & Hawes C. (1999) Biosynthesis and immunolocalization of Lewis a-containing N-glycans in the plant cell. *Plant Physiology*, Vol. 121, pp. 333-44
- Follet-Gueye, M.L., Pagny, S., Faye, L., Gomord, V. & Driouich, A. (2003) An improved chemical fixation method suitable for immunogold localization of green fluorescent protein in the Golgi apparatus of tobacco bright yellow (BY-2) cells. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, Vol. 51, pp.931-940
- Gibeaut D.M. & Carpita N.C. (1994) Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides. *FASEB J.*, Vol. 8, pp. 904-915
- Gilbert, H.J. (2010) The biochemistry and structural biology of plant cell wall deconstruction. *Plant Physiology*, Vol.153, pp. 444-455
- Harholt J., Jensen J.K., Sørensen S.O., Orfila C., Pauly M. & Scheller H.V. (2006) ARABINAN DEFICIENT 1 is a putative arabinosyltransferase involved in biosynthesis of pectic arabinan in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, Vol. 140, pp. 49-58
- Harris P.J. & Northcote D.H., (1971). Polysaccharide formation in plant Golgi bodies. *Biochemistry and Biophysical Acta.*, Vol. 237, pp. 56-64
- Hawes M.C., Bengough G., Cassab G. & Ponce G. (2003) Root caps and rhizosphere. *Journal of Plant Growth Regulation*, Vol. 21, pp.352-367
- Hématy, K., Cherk, C. & Somerville, S. (2009) Host-pathogen warfare at the plant cell wall. *Current Opinion in Plant Biology*, Vol.12, pp. 406-413
- Jauh, G.Y. & Lord E.M. (1996) Localization of pectins and arabinogalactan-proteins in lily (*Lilium longiflorum* L.) pollen tube and style, and their possible roles in pollination *Planta*, Vol.199, pp. 251-261
- Johnson-Brousseau, S.A. & McCormick, S. (2004) A compendium of methods useful for characterizing *Arabidopsis* pollen mutants and gametophytically expressed genes. *The Plant Journal*, Vol. 39, pp. 761-775
- Jones, L., Seymour, G.B., & Knox, J.P. (1997) Localization of pectic galactan in tomato cell walls using a monoclonal antibody specific to (1->4)-beta-D-galactan. *Plant Physiology*, Vol.113, pp. 1405-1412.
- Langhans M., Förster S., Helmchen G. & Robinson D.G. (2011) Differential effects of the brefeldin A analogue (6R)-hydroxy-BFA in tobacco and *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 62, pp. 2949-2957
- Lee, K.J.D., Marcus S.E. & Knox J.P. (2011) Cell wall biology: Perspectives from cell wall imaging. *Molecular Plant*, Vol.4, pp. 212-219
- Lehner, A., Dardelle, F., Soret-Morvan, O., Lerouge, P., Driouich, A., & Mollet, J.C. (2010) Pectins in the cell wall of *Arabidopsis thaliana* pollen tube and pistil. *Plant Signaling and Behavior*, Vol.5, pp. 1282-1285

- Li, Y.Q., Bruun, L., Pierson, E.S. & Cresti, M. (1992) Periodic deposition of arabinogalactan epitopes in the cell wall of pollen tubes of *Nicotiana tabacum* L. *Planta*, Vol.188, pp. 532-538
- Liepmann, A.H., Wightman, R., Geshi, N., Turner, S.R. & Scheller, H.V. (2010) Arabidopsis - a powerful model system for plant cell wall research. *The Plant Journal*, Vol.61, pp. 1107-1121
- Marcus, S.E., Verhertbruggen, Y., Herve, C., Ordaz-Ortiz, J.J., Farkas, V., Pedersen, H.L., Willats, W.G.T. & Knox, J.P. (2008) Pectic homogalacturonan masks abundant sets of xyloglucan epitopes in plant cell walls. *BioMedCentral Plant Biology*, Vol.8, pp. 60-71
- Mayhew, T.M., Lucocq, J.M. & Griffiths, G. (2002) Relative labelling index: a novel stereological approach to test for non-random immunogold labelling of organelles and membranes on transmission electron microscopy thin sections. *Journal of Microscopy*, Vol. 205, pp.153-164
- Mayhew T.M. (2011) Quantifying immunogold localization on electron microscopic thin sections: a compendium of new approaches for plant cell biologists. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 62, pp. 4101-4113
- Micheli F. (2001) Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends in Plant Sciences*, Vol. 6, pp.414-419
- Moller, I., Marcus, S.E., Haeger, A., Verhertbruggen, Y., Verhoef, R., Schols, H., Mikkelsen, J.D., Knox, J.P. & Willats, W. (2008) High-throughput screening of monoclonal antibodies against plant cell wall glycans by hierarchical clustering of their carbohydrate microarray binding profiles. *Glycoconjugate Journal* Vol. 25, pp. 37-48.
- Mollet, J.C., Park, S.Y., Nothnagel, E.A. & Lord, E.M. (2000) A lily stylar pectin is necessary for pollen tube adhesion to an in vitro stylar matrix. *The Plant Cell*, Vol.12, 1737-1749
- Mollet, J.C., Kim, S., Jauh, G.Y. & Lord, E.M. (2002) AGPs, pollen tube growth and the reversible effects of Yariv phenylglycoside. *Protoplasma*, Vol.219, pp. 89-98
- Mollet, J.C., Faugeron, C. & Morvan, H. (2007) Cell adhesion, separation and guidance in compatible plant reproduction, In: *Plant Cell separation and adhesion*, Roberts, J. & Gonzalez-Carranza, Z. (Ed.), *Annual Plant Reviews*, Vol.25, pp. 69-90
- Mouille, G., Ralet, M.C., Cavelier, C., Eland, C., Effroy, D., Hématy, K., McCartney, L., Truong, H.N., Gaudon, V., Thibault, J.F., Marchant, A. & Höfte, H. (2007) Homogalacturonan synthesis in Arabidopsis thaliana requires a Golgi-localized protein with a putative methyltransferase domain. *The Plant Journal*, Vol.50, pp. 605-614
- Pagny S., Bouissonnie F., Sarkar M., Follet-Gueye M.L., Driouich A., Schachter H., Faye L. & Gomord V. (2003) Structural requirements for Arabidopsis beta1,2-xylosyltransferase activity and targeting to the Golgi. *The Plant Journal*, Vol. 33, pp. 189-203
- Pattathil, S., Avci, U., Baldwin, D., Swennes, A.G., McGill, J.A., Popper, Z., Bootten, T., Albert, A., Davis, R.H., Chennareddy, C., Dong, R., O'Shea, B., Rossi, R., Leoff, C., Freshour, G., Narra, R., O'Neil, M., York, W.S. & Hahn, M.G. (2010) A comprehensive toolkit of Plant cell wall glycan-directed monoclonal antibodies. *Plant Physiology*, Vol.153, pp. 514-525.
- Pennell, R.I., Janniche, L., Kjellbom, P., Scofield, G.N., Peart, J.M. & Roberts, K. (1991) Developmental regulation of a plasma membrane arabinogalactan protein epitope in oilseed rape flowers. *The Plant Cell*, Vol.3, pp. 1317-1326.
- Puhlmann, J., Bucheli, E., Swain, M.J., Dunning, N., Albersheim, P., Darvill, A.G. & Hahn, M.G. (1994) Generation of monoclonal antibodies against plant cell wall polysaccharides. I. Characterization of a monoclonal antibody to a terminal alpha-(1,2)-linked fucosyl-containing epitope. *Plant Physiology*, Vol.104, pp. 699-710
- Qin, Y. & Zhao, J. (2006). Localization of arabinogalactan proteins in egg cells, zygotes, and two-celled proembryos and effects of β -D-glucosyl Yariv reagent on egg cell

- fertilization and zygote division in *Nicotiana tabacum* L. *Journal of Experimental Botany*, Vol.57, pp. 2061-2074
- Ray P.M. (1980) Cooperative action of beta-glucan synthetase and UDP-xylose xylosyl transferase of Golgi membranes in the synthesis of xyloglucan-like polysaccharide. *Biochimistry and Biophysical Acta*, Vol. 629, pp. 431-444
- Sandhu, A.P.S., Randhawa, G.S. & Dhugga, K.S. (2009) Plant cell wall matrix polysaccharide biosynthesis. *Molecular Plant*, Vol. 2, pp. 840-850
- Seifert, G.J. & Blaukopf, C. (2010) Irritable walls: the plant extracellular matrix and signaling. *Plant Physiology*, Vol.153, pp. 467-478
- Smyth, D.R., Bowman, J.L. & Meyerowitz, E.M. (1990) *Early flower development in Arabidopsis*. *The Plant Cell*, Vol.2, pp. 755-767
- Staehelin L.A., Giddings T.H. Jr, Kiss J.Z. & Sack F.D. (1990) Macromolecular differentiation of Golgi stacks in root tips of Arabidopsis and Nicotiana seedlings as visualized in high pressure frozen and freeze-substituted samples. *Protoplasma*, Vol. 157, pp. 75-91
- Studer, D., Graber, W., Al-Amoudi, A. & Egli, P. (2001) A new approach for cryofixation by high-pressure freezing. *Journal of Microscopy*, Vol. 203, pp.285-294
- Toyooka K., Goto Y., Asatsuma S., Koizumi M., Mitsui T. & Matsuoka K. (2009) A mobile secretory vesicle cluster involved in mass transport from the Golgi to the plant cell exterior. *The Plant Cell*, Vol. 4, pp. 1212-1229
- Van Donselaar E., Posthuma G., Zeuschner D., Humbel B.M. & Slot J.W. (2007). Immunogold labeling of cryosections from high-pressure frozen cells. *Traffic*, 8: 471-485
- Vicré, M., Santaella, C., Blanchet, S., Gateau, A. & Driouich, A. (2005) Root border-like cells of Arabidopsis. Microscopical characterization and role in the interaction with rhizobacteria. *Plant Physiology*, Vol.138, pp. 998-1008
- Viotti C., Bubeck J., Stierhof Y.D., Krebs M., Langhans M., van den Berg W., van Dongen W., Richter S., Geldner N., Takano J., Jürgens G., de Vries S.C., Robinson D.G. & Schumacher K. (2010) Endocytic and secretory traffic in Arabidopsis merge in the trans-Golgi network/early endosome, an independent and highly dynamic organelle. *The Plant Cell*, Vol. 22, pp. 1344-1357
- Willats, W.G.T., Marcus, S.E. & Knox, J.P. (1998) Generation of a monoclonal antibody specific to (1->5)-alpha-L-arabinan. *Carbohydrate Research*, Vol.308, pp. 149-152.
- Willats W.G., McCartney L. & Knox J.P. (2001) In-situ analysis of pectic polysaccharides in seed mucilage and at the root surface of Arabidopsis thaliana. *Planta*, Vol. 213, pp. 37-44
- Willats W.G., McCartney L., Steele-King C.G., Marcus S.E., Mort A., Huisman M., van Alebeek G.J., Schols H.A., Voragen A.G., Le Goff A., Bonnin E., Thibault J.F. & Knox J.P. (2004) A xylogalacturonan epitope is specifically associated with plant cell detachment. *Planta*, Vol. 218, pp.673-81
- Wu, H., de Graaf, B., Mariani, C. & Cheung, A. Y. (2001). Hydroxyproline rich glycoproteins in plant reproductive tissues: structure, functions and regulation. *Cell and Molecular Life Sciences*, Vol.58, pp. 1418-1429
- Yates, E.A., Valdor, J.-F., Haslam, S.M., Morris, H.R., Dell, A., Mackie, W. & Knox, J.P. (1996) Characterization of carbohydrate structural features recognized by anti-arabinogalactan-protein monoclonal antibodies. *Glycobiology*, Vol.6, pp. 131-139.
- Zhang G.F. & Staehelin L.A. (1992) Functional compartmentalization of the Golgi apparatus of plant cells: an immunochemical analysis of high pressure frozen/freeze substituted sycamore suspension-cultured cells. *Plant Physiology*, Vol. 99, pp. 1070-1083

10 – Annexe 02 : Appel à projet pour contrat doctoral

LABEX DRIIHM

Dispositif de Recherche Interdisciplinaire sur les Interactions Hommes-Milieux

Appel à Projet pour Contrat doctoral 2013

L'appel à projet doctoral du Labex DRIIHM pour l'année 2013 ouvre au concours deux contrats pleins pour 3 années consécutives (début : octobre 2013).

Conditions d'éligibilité :

Outre celles qui concernent les conditions de droit pour s'inscrire en doctorat dans une université française :

- Le projet doit concerner **directement au moins un OHM** et s'adresser **au cœur de ses problématiques**.
- Il doit être pertinent avec le contexte OHM
- Le(s) directeur(s) de la thèse (ou au moins l'un deux en cas de direction multiple) **doit (doivent) appartenir à (aux) OHM concerné(s)**.

Dossier :

Il doit être constitué :

1. du projet de thèse (maximum 5 pages) signalant notamment de manière explicite, outre le cœur de la recherche envisagée,
 - a. quel est l'OHM concerné (ou les OHM)
 - b. quels sont les méthodes et moyens dont l'utilisation serait envisagée pour mener la recherche.
 - c. quel est l'apport que ce projet serait susceptible de constituer pour le développement de la recherche dans l'OHM concerné (ou les OHM) et le rapport avec les problématiques qui le (les) caractérise(nt).
2. du CV court du directeur de la thèse (et, éventuellement des co-directeurs, tuteurs, etc.) et d'une déclaration marquant de sa (leur) part l'acceptation de cette direction,
3. du CV du candidat, s'il est déjà identifié.

Bien que ce ne soit pas une condition *sine qua non*, les sujets pluri- voire interdisciplinaires seront considérés avec la plus grande attention. Ils devront alors présenter les meilleures garanties de succès (directions scientifiques, disponibilité des équipements nécessaires, etc.)

Calendrier :

Ouverture de l'appel : 1^{er} Mai 2013

Clôture de l'appel : 12 Juin 2013

Résultat : 9 Juillet 2013

Les dossiers (*projet de thèse, CV court du DDR, éventuellement CV du doctorant, et feuille d'accompagnement ci-après*) doivent être **déposés par le directeur de thèse** le plus rapidement possible et **exclusivement sous forme électronique et par mail**, auprès des **directeurs d'OHM concernés, de la direction du DRIIHM** (<Robert.Chenorkian@cnrs-dir.fr>) **et du réseau** (<maignan@eccorev.fr>).

En cas de sujet concernant plusieurs OHM, les dossiers doivent être envoyés simultanément à chacun d'eux.

DRIHM

APPEL À PROJET DOCTORAL 2013

OHM concerné(s) : Téssékéré

Titre du sujet de thèse : Interactions biotiques au sein de la rhizosphère de *Balanites aegyptiaca*, essence ligneuse de la Grande Muraille Verte (GMV)

Mots-Clés caractérisant le sujet (6 au plus) : Grande Muraille Verte, *Balanites aegyptiaca*, santé des sols, rhizosphère, interaction plante-microorganismes telluriques

Articulation avec la recherche de l'OHM (des OHM) concerné(s) (Maximum 10 l.) :

Les objectifs de ce projet de thèse rentrent pleinement dans les préoccupations de l'OHM Téssékéré. En effet, les principaux acteurs de ce projet ont déjà démarré des travaux de recherche dans le contexte OHM Téssékéré, soit à travers la coordination de projets « petite-échelle » financés par l'OHM dans les domaines de la biologie végétale (D. Goffner) et de la microbiologie des sols (G. Grundmann), soit par engagement, jusqu'à présent, informel (ML. Follet-Gueye). Les recherches proposées dans le présent projet pourraient à terme aider à proposer les meilleures combinaisons d'arbres sur un sol donné et à améliorer les pratiques de sylviculture afin de restructurer au mieux les sols, conduisant à une meilleure gestion des ressources naturelles à la fois adaptées au climat hostile sahélien tout en étant d'une grande utilité pour l'Homme. Cela nous semble le point de mire, à travers des démarches de type « recherche – action », de l'OHM Téssékéré.

Nom et rattachement du (des) directeur(s) de la thèse : Marie Laure Follet-Gueye, Maître de Conférence
EA4358 GlycoMEV-Université de Rouen, France

Deborah Goffner – UMI ESS 3189 Marseille France

Nom du candidat (le cas échéant) : non identifié

Co-financeur éventuel du projet : OHM Téssékéré

Noms et coordonnées mél de 4 rapporteurs possibles :

Magalie Pichon - UMR 5546 UPS/CNRS Toulouse, France (Magalie.Pichon@toulouse.inra.fr)

Luc Abbadie - BIOEMCO ENS, Paris, abbadie@biologie.ens.fr

Jérôme Pelloux - EA3900-BIOPI, Université de Picardie, Amiens, France. (jerome.pelloux@u-picardie.fr)

Catherine Santaella, UMR 6191 - CEA - CNRS - Université Aix-Marseille II (catherine.santaella@cea.fr).

Nom et coordonnées mél du directeur de l'École Doctorale dans laquelle le sujet serait susceptible d'être inscrit :

Patrice Lerouge : patrice.lerouge@univ-rouen.fr

1-Introduction et contexte de l'étude

Pour répondre aux enjeux de la désertification, 11 pays situés en zone sahélienne ont adopté l'initiative du projet panafricain, appelé la Grande Muraille Verte (GMV). L'objectif global de la GMV est de contribuer i) à la lutte contre l'avancée du désert, ii) à la mise en valeur des zones saharo-sahéliennes pour une gestion durable des ressources naturelles et iii) à la lutte contre la pauvreté. Il s'agit de l'édification d'un ensemble de zones de reboisement d'environ 15 km de large traversant à terme tout le continent africain (7000 km d'est en ouest).

Comme décrit pour de nombreux territoires du continent africain (Gilbert, 2012), la pauvreté du sol dans la zone sahélienne est une entrave au développement agricole. En effet, des analyses chimiques du sol sur la zone sahélienne du Ferlo (zone GMV) révèlent son faible niveau de carbone. Outre l'apport de fertilisants chimiques coûteux et dont l'usage à long terme peut être dommageable pour l'environnement, envisager d'autres alternatives devient impératif aussi bien pour des applications locales mais également pour les pratiques agricoles à l'échelle de la planète. Les communautés microbiennes des sols ont des caractéristiques qui reflètent finement l'environnement physico-chimique et biologique du milieu dans lequel elles évoluent. Elles conservent dans leur structure et leur composition l'héritage des événements et paramètres qui les ont influencées et peuvent être ainsi le témoin de l'évolution d'un système. L'évaluation de l'évolution de leur composition, des changements de diversité, est donc primordiale.

2-Description du projet de thèse

Cette thèse sera co-dirigée par les Dr Deborah Goffner (CNRS UMI 3189 / Sénégal – Burkina Faso – Mali – France) et ML. Follet-Gueye (EA 4358, Laboratoire Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale, Université de Rouen). Le Dr Geneviève Grundmann (UMR 5557, Laboratoire d'Ecologie Microbienne, Université Claude Bernard Lyon I) participera également à cette thèse en tant que partenaire.

L'objectif de ce projet, est d'étudier les interactions entre une espèce ligneuse fortement implantée dans la zone GMV (zone sahélienne du Ferlo au Sénégal), *Balanites aegyptiaca* ou dattier du désert, et les microorganismes du sol.

Nous suivrons des cinétiques qualitative et quantitative des caractéristiques respectives des deux composantes plante-sol à partir de dispositifs expérimentaux *in situ* au niveau du site de la GMV (parcelle expérimentale OHM-Tessékéré) et de laboratoires (GlycoMEV- UMR 5557).

L'arbre de choix pour cette étude : *Balanites aegyptiaca*

Balanites aegyptiaca (L) Del. est une espèce de la flore tropicale très adaptée aux écosystèmes sahéliens. Les études éco-géographiques montrent que l'espèce occupe plusieurs régions sahélo-sahariennes d'Afrique et du Moyen Orient. De large amplitude écologique, cette espèce ligneuse est très résistante à la sécheresse. De plus, les résultats obtenus des enquêtes ethnobotaniques par les chercheurs de l'OHM (Observatoire Homme Milieux) GMV montrent que les populations du Ferlo apprécient grandement cette espèce (l'espèce d'arbre la plus citée) pour ses nombreux usages : alimentation, fourrage, bois de chauffe et de construction et santé (Niang *et al*, 2012). La commercialisation des fruits pourrait également présenter un intérêt socio-économique pour les populations, et ceci notamment pour les femmes. Pour l'ensemble de ces raisons, *Balanites aegyptiaca* fait partie des espèces choisies pour la restauration des écosystèmes sahéliens dans le contexte de la Grande Muraille Verte. A ce titre, *Balanites aegyptiaca* fait déjà l'objet de plusieurs projets au sein de l'OHM (avec une forte implication du Dr D. Goffner, co-directrice de cette thèse), comme la recherche de la variabilité intraspécifique des critères morphologiques, la valeur nutritionnelle des fruits, et même une étude du type 'chaîne de valeur'. Par ailleurs, des collaborations à l'échelle internationale sont en cours d'élaboration entre l'OHM et John Weber (*The International Centre for Research in Agroforestry*, ICRAF), un des leaders mondiaux dans le domaine de la foresterie tropicale et spécialiste de *Balanites aegyptiaca*.

3- Dispositifs expérimentaux et plan de travail

Au laboratoire

Des plants de *Balanites aegyptiaca* seront cultivés en pot au laboratoire GlycoMEV. Afin d'être au plus proche des conditions de culture du site GMV, les plants seront maintenus en « condition pépinière » 2 à 3 mois (irrigués) puis transférés ensuite sur le sol GMV natif ou stérilisé. Cette dernière partie des cultures expérimentales sera menée en conditions d'hydratation variables. L'impact des microorganismes du sol GMV et du niveau d'hydratation sur le développement des plants de *Balanites aegyptiaca* sera évalué sur la base du relevé des paramètres généraux de développement des plants (vitesse de croissance, morphologie, architecture et biomasse des systèmes caulinaires et racinaires).

Une attention particulière sera donnée à la description du système racinaire (biomasse et degré de ramification). Ces observations seront complétées par la caractérisation des cellules « frontières » (CF) de racines dans les différentes conditions de culture. Les CF sont des cellules produites en continu par la coiffe racinaire (Hawes *et al.*, 2000 ; Vicré *et al.*, 2005) et leur intérêt provient du fait qu'elles participent activement à la production d'exsudats racinaires et, ainsi, jouent un rôle primordial à l'interface plante-sol (Driouich *et al.*, 2010). Très peu de données (Endo *et al.*, 2011) existent sur les cellules frontières des espèces ligneuses sélectionnées pour la GMV. Dans ce travail, leur caractérisation sera réalisée par des approches biochimique et immocytochimique parfaitement maîtrisées au laboratoire GlycoMEV.

L'étude des exsudats de la rhizosphère sera également menée tout au long de ce dispositif expérimental de culture de *Balanites aegyptiaca*. La composition en molécules connues pour être impliquées dans les interactions plante-microorganismes au sein de la rhizosphère : composés phénoliques (Bais *et al.*, 2006), polysaccharides (Ray *et al.*, 2004 ; Aboughe-Angone *et al.*, 2008) - protéoglycanes (arabinogalactane protéines, AGPs ; Vicré *et al.*, 2005 ; Cannesan *et al.*, 2012 ; Nguema-Ona *et al.*, 2013) et ADN extracellulaire (extracellular DNA, exDNA ; Wen *et al.*, 2009) sera déterminée. Les teneurs en composés phénoliques seront établies par chromatographie liquide HPLC. Les compositions en polysaccharides (PS) et AGPs seront déterminées par des approches biochimiques (dosages colorimétriques, électrophorèse en gel d'agarose et chromatographie en phase gazeuse) et immunocytochimiques (*via* des sondes anticorps spécifiques des PS). La présence d'exDNA sera détectée par des colorants et des sondes anticorps spécifiques.

Parallèlement aux études menées sur le partenaire végétal, et pour appréhender l'effet de *Balanites aegyptiaca* sur les populations microbiennes du sol, une approche microbiologique sera réalisée pour rechercher des modifications éventuelles de la diversité bactérienne entre sol GMV natif rhizosphérique et non rhizosphérique au cours de l'installation des plants de *Balanites aegyptiaca*. Elle se fera sur la microflore totale par pyroséquençage de l'ADNr 16S dans l'ADN extrait des deux types de sol. Conjointement, le groupe des bactéries bénéfiques au développement de la plante (ou *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*, PGPR) qui pourrait intervenir dans le succès de croissance de *Balanites aegyptiaca* sur le terrain sera étudié. Pour ce faire, sur les mêmes ADN extraits, l'expression de trois gènes liés à l'effet PGPR (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase gene, acds et pHID impliqués dans la modulation de la balance hormonale de la plante, nitrogen fixation regulator gene, nifH impliqué dans la fixation d'azote) sera étudiée par la technique de qPCR.

Pour qualifier plus précisément les possibles interactions entre les CFs et les bactéries PGPRs, de jeunes plants de *Balanites aegyptiaca* cultivés en conditions hydroponiques sur substrat inerte type vermiculite ou *in vitro* (milieu gélosé) seront inoculés par deux bactéries PGPRs modèles (genres *Pseudomonas* et/ou *Azospirillum*). Les souches bactériennes marquées par une protéine fluorescente seront localisées au sein de la rhizosphère par microscopie confocale à balayage laser (en collaboration avec C. Prigent-Combaret, UMR CNRS 5557 et plateforme d'imagerie cellulaire PRIMACEN de l'Université de Rouen) afin d'évaluer le tropisme potentiel des PGPR vis-à-vis des CF.

in situ : parcelle expérimentale OHM-Tessékéré

Cette partie du travail s'appuiera sur une parcelle de recherche expérimentale en cours de montage située dans la région du Ferlo, à Widou, Sénégal (dans le cadre d'un projet OHM financé) qui va inclure, parmi les onze espèces d'arbres locaux plantées, des plants de *B. aegyptiaca*, issus de deux provenances (Sénégal et Burkina Faso). Typiquement, sur ce site de la GMV, les essences choisies pour le reboisement sont mises à germer en pépinière sur substrat légèrement enrichi (sable et excréments d'animaux) en condition d'irrigation pendant une durée de 2 à 3 mois. Lors de la saison humide, les plants issus de la pépinière sont repiqués sur les zones de reboisement.

Les paramètres de développement des jeunes arbres (morphologie, croissance racinaire et aérienne, caractérisation chimique d'exsudats racinaires...) seront suivis. Ces analyses seront complétées par une comparaison entre la diversité des communautés microbiennes dans des sols rhizosphérique par rapport au sol des zones en friche au sein de la même parcelle, mais aussi dans le sol avant plantation. L'analyse sera réalisée par pyroséquençage de l'ADNr 16S dans l'ADN extrait de sol prélevé sur le terrain en association ou pas avec *B. aegyptiaca*. Enfin, la structure et la chimie (matière organique) des sols seront également comparées pour déterminer une valeur ajoutée éventuelle sur la qualité des sols liée à la plantation de *B. aegyptiaca*.

4 -Résultats attendus

Ce travail permettra de mesurer le potentiel de *B. aegyptiaca*, une des espèces choisies pour le reboisement tout au long de la GMV, à améliorer la biodiversité et l'abondance des microorganismes du sol sahélien. Nous espérons également contribuer aux connaissances, encore très fragmentaires, expliquant la très grande adaptabilité de l'espèce aux conditions environnementales hostiles. L'ambition de ce travail est d'optimiser l'implantation de *B. aegyptiaca* mais également d'autres espèces de la GMV, qui ensemble contribueront à restructurer durablement les sols sahéliens et à pérenniser ainsi des activités forestières dans cette zone. Avec la technique du séquençage profond, nous fournirons une base de données de référence exhaustive pour la microbiologie des sols sahéliens. Au-delà des acquis purement appliqués, les études de laboratoire aideront à une meilleure compréhension de l'implication des cellules frontières de racine, éléments clefs de l'interface plante-sol, dans les interactions biotiques.

5- Conclusion

Ce projet regroupe des laboratoires reconnus internationalement dans des domaines complémentaires en biologie et physiologie végétales et en microbiologie des sols. Cette confrontation interdisciplinaire, au-delà d'une plus-value cognitive évidente, propose des méthodologies extrêmement diversifiées (biologie cellulaire, biochimie des polysaccharides, microscopie, génomique) en les mettant aux services d'un des grands enjeux situé à l'intersection de la société et de l'environnement : le renversement de la désertification en Afrique. Le contexte de l'OHM GMV est particulièrement bien adapté pour cette étude. Ce projet de thèse renforcerait une collaboration déjà engagée de façon informelle par les chercheurs proposant ce projet. De plus, ce travail intègre une nouvelle équipe de l'UMI ESS /OHM, « Environnement Végétal et Sociétés ». Les recherches décrites dans le présent projet pourraient à terme aider à proposer les meilleures combinaisons d'arbres sur un sol donné et à améliorer les pratiques de sylviculture afin de restructurer au mieux les sols, conduisant à une meilleure gestion des ressources naturelles à la fois adaptées au climat hostile sahélien tout en étant d'une grande utilité pour l'Homme.

Références :

- Aboughe-Angone *et al.* (2008). Carbohydr Res. 14;343(1):67-72.
- Bais *et al.* (2006). Annu. Rev. Plant Biol. (57):233-66.
- Cannesan *et al.* (2012). Plant Physiol. 159(4):1658-70.
- Driouich *et al.* (2010). J. Exp. Bot. (14): 3827-3831.
- Endo *et al.* (2011). Ann. Bot. (108): 279-290.
- Gilbert (2012). Nature (483) :525-527.
- Hawes *et al.* (2000). Trends Plant Sci, (5): 128-133.

Nguema-Ona *et al.* (2013). Trends Plant Sci. doi:pii: S1360-1385(13)00059-9. 10.1016/j.tplants.
Niang *et al.* (2012) Dans Les Plantes du Sahel, CNRS éditions pp 43-58.
Ray *et al.* (2004). Carbohydr Res. 22;339(2):201-8.
Vicré *et al.*, 2005. Plant Physiol. 138 (2):998-1008.
Wen F *et al.* (2009). Plant Physiol. (151): 820-829.

Déclaration d'acceptation de la direction de la thèse

Nous soussignées, **Marie Laure Follet-Gueye**, Maître de Conférence à l'EA4358 GlycoMEV-Université de Rouen, France, et **Deborah Goffner**, Directrice de Recherche CNRS à l'UMI ESS 3189 Marseille, France, déclarons notre enthousiasme pour le co-encadrement de cette thèse.



Marseille, le 10 juin 2013

Deborah Goffner



Rouen le 10 Juin 2013, Marie-Laure Follet-Gueye

Dispositif de Recherche Interdisciplinaire sur les Interactions Hommes-Milieux

Projets doctoraux : résultats 2013

OHM	Directeur	Sujet	Candidats	Mots-Clés	Résultats
Essékéré	GOFFNER Deborah, UMI 3189 ESS, Marseille FOLLET-GUEYE Marie-Laure, maître de conférence, EA4358 GlycoMEV (Université de Rouen)	Interactions biotiques au sein de la rhizosphère de <i>Balanites aegyptiaca</i> , essence ligneuse de la Grande Muraille Verte (GMV)	à identifier	Grande Muraille Verte, <i>Balanites aegyptiaca</i> , santé des sols, rhizosphère, interaction plante-microorganismes telluriques	Liste principale 1er
Oyapock	CLAIR Bruno Clair, chargé de recherche HDR, sciences du bois, UMR EcoFoG Guyane (CNRS) DAVY Damien, ingénieur de recherche CNRS, ethnologue, OHM Oyapock-USR 3456 Guyane (CNRS)	Savoirs locaux sur les usages et propriétés technologiques des bois de construction du bas-Oyapock (Guyane française)	OGERON Clémence	bois, construction, savoirs locaux, Oyapock, mécanique, ethnobotanique	Liste principale 2ème
Haut-Videssos	BRIOTTET Xavier, ONERA HOUE Thomas, UMR 5602 GEODE (CNRS – Université de Toulouse 2)	Caractérisation de la biodiversité végétale en milieu montagnard et de piedmont par télédétection : apport des données aéroportées à très haute résolution spatiale et spectrale	à identifier	télédétection aéroportée, hyperspectral, fonctionnalité écologique, traitement du signal, modélisation	Liste complémentaire 1er
Nunavik	MARTIN Jean-Louis, directeur de recherche, UMR 5175 CEFE (CNRS), Montpellier ; BLANGIER Sylvie, ingénieur de recherche, UMR 5175 CEFE (CNRS), Montpellier ; RODON Thierry, professeur, Chaire de recherche sur le développement durable du Nord (Université de Laval Québec).	Evolution des interactions hommes milieux dans l'Arctique dans un contexte de changement global et d'industrialisation.	DEFFNER Anna	industrialisation, impacts miniers, socio-écosystèmes, caribou, santé, construction de connaissances, recherche collaborative	Liste complémentaire 2ème
Nunavik	ETIENNE Samuel, directeur d'études EPHE, Prodig (CNRS), Dinard ; MERCIER Denis, professeur à l'Université de Nantes, IUF, UMR LETG (CNRS) ; DECAULNE Armelle, chargé de recherche, UMR LETG (CNRS).	Réchauffement climatique en Arctique : approches quantitatives, cartographiques et perceptives des mutations paysagères dans la région de Kangiqsuaq, Québec.	COLLET Maëlle	mutations paysagères, géomorphologie paraglaciaire, indicateurs environnementaux, savoirs environnementaux traditionnels	Non classé
BMP	HERNANDEZ Solange, maître de conférences HDR, EA 4225 CERGAM (Aix-Marseille Université), équipe « management public et gouvernance territoriale » ; GACHET Sophie, maître de conférences, UMR 7263 IMBE (Aix-Marseille Université), sophie.gachet@imbe.fr BATTEAU Pierre, professeur (Aix-Marseille Université), EA 4225 CERGAM (Aix-Marseille Université), pierre.batteau@iae-aix.com	Territorial management of biodiversity in a context of urbanization and intense interactions man-nature. A multi-site analysis.	BOUTIN Nathalie	biodiversity management, territorial management, man-nature interactions, urbanization	Non classé
Haut-Videssos	VERGNOLLE-MAINAR Christine, maître de conférences HDR, UMR 5602 GEODE (CNRS – Université de Toulouse 2), IUFM Midi-Pyrénées (école interne de l'Université de Toulouse 2), membre de l'OHM Pyrénées – Haut-Videssos.	Mobilisation de savoirs scientifiques en construction dans les enseignements (primaire et secondaire)	à identifier	savoirs scientifiques de référence, transposition didactique, interdisciplinarité, géographie,	Non classé
LittMed	Pr. MAUPERTUIS Marie-Antoinette, UMR 6240 LISA (CNRS) MICHEL Franck, MCF HDR en sociologie	Dynamiques associatives et institutionnalisation de la problématique environnementale : le cas du littoral corse	GRAZIANI- TAUGERON Claire	Littoral, Corse, associations de défense de l'environnement, conflits d'usage, politique territoriale, gestion intégrée	Non classé
BMP Estarreja LittMed	DOMENACH Hervé, spacio-démographe, professeur des universités, laboratoire LIEU (Aix-Marseille Université) ARNAUD Aurélie, géographe et cartographe, maître de Conférences, laboratoire LIEU (Aix-Marseille Université), partenaire de l'OHM-BMP	Mise en scène des risques et des nuisances en faveur de la résilience des territoires industriels. Cas des communes du Bassin minier de Provence, du sud de l'Etang de Berre, Marseille et Estarreja (Portugal)	GORBUNOVA Tatiana	territoires industriels, représentation des risques, nuisances, résilience	Non classé