



HAL
open science

Caractérisation fonctionnelle de gènes impliqués dans le développement du pollen chez *Arabidopsis thaliana*

Benjamin Lallemand

► **To cite this version:**

Benjamin Lallemand. Caractérisation fonctionnelle de gènes impliqués dans le développement du pollen chez *Arabidopsis thaliana*. Biologie végétale. Université de Strasbourg, 2012. Français. NNT : 2012STRAJ076 . tel-00804448

HAL Id: tel-00804448

<https://theses.hal.science/tel-00804448>

Submitted on 26 Mar 2013

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.

ÉCOLE DOCTORALE

Sciences de la Vie et de la Santé ED 414

THÈSE présentée par :

Benjamin LALLEMAND

soutenue le : **19 octobre 2012**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline / Spécialité : Sciences du vivant

Aspects moléculaires et Cellulaires de la Biologie

**Caractérisation fonctionnelle de gènes
impliqués dans le développement du
pollen chez *Arabidopsis thaliana***

Thèse dirigée par :

Dr **LEGRAND Michel**

Directeur de thèse

Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Dr **LESSIRE René**

Dr **HEHN Alain**

Rapporteur externe

Rapporteur externe

Université Bordeaux Segalen

Université de Nancy

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Dr **RITZENTHALER Christophe**

Examineur interne

Université de Strasbourg

Remerciements

Je tiens à remercier Alain Hehn, René Lessire et Christophe Ritzenthaler d'avoir accepté de juger mes travaux de thèse.

Je remercie profondément mes directeurs de thèse, Docteur Michel Legrand et Docteur Thierry Heitz, de m'avoir accueilli dans leur laboratoire. Leur disponibilité, leurs conseils avisés et leur passion m'ont permis de mener ma thèse dans des conditions optimales.

Je souhaite également exprimer ma gratitude à toutes les personnes qui ont partagé de leur temps et de leur expérience pour que je puisse parfaire ma formation :

Pierrette Geoffroy, Mathieu Erhardt, Jerome Mutterer, Jean-michel Daviere, Dimitri Heintz, Raphaël Lugan, Denise Meyer.

Merci à Etienne Grienberger pour l'exemple qu'il m'a donné du doctorant passionné.

Mes remerciements iront également à Pascaline Ullmann et toute l'équipe de moniteurs et maîtres de conférences qui m'ont accompagné durant cette expérience formidable qu'était l'enseignement.

Merci à toi, bactérie, levure, plante qui a donné sa vie à la science.

Merci à toi lecteur de l'attention que tu portes à ce projet.

Enfin, je remercie ma moitié et ma famille pour leur soutien et les valeurs qu'ils m'ont communiqué et qui m'ont permis d'en être là où je suis.

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	- 0 -
I. Développement de la fleur et du pollen.....	- 1 -
1. Préambule	- 1 -
2. Du développement floral au grain de pollen.....	- 1 -
2.1. Origine évolutive des fleurs.....	- 2 -
2.2. La formation des fleurs.....	- 2 -
2.2.1. Description anatomique.....	- 2 -
2.2.2. Les gènes contrôlant le développement des fleurs.....	- 3 -
2.3. Le développement des étamines.....	- 4 -
2.3.1. Description anatomique.....	- 4 -
2.3.2. Les gènes contrôlant le développement des étamines.....	- 5 -
2.3.2.1. Spécification des couches cellulaires de l'anthere.....	- 5 -
2.3.2.2. Développement du tapétum et formation de la paroi pollinique.....	- 6 -
2.4. Le développement du pollen, gamétophyte mâle des végétaux.....	- 7 -
3. Le développement de la paroi pollinique	- 8 -
3.1. Acteurs cellulaires impliqués.....	- 9 -
3.2. Cinétique de formation de la paroi pollinique.....	- 9 -
3.3. Identification des acteurs protéiques impliqués.....	- 11 -
3.3.1. Synthèse de la primexine.....	- 11 -
3.3.2. Ondulation de la membrane plasmique.....	- 12 -
3.3.3. Synthèse de la paroi de callose.....	- 12 -
3.3.4. Synthèse de l'exine.....	- 13 -
II. Métabolismes associés au développement de la paroi du pollen.....	- 16 -
1. Les voies métaboliques associées à la synthèse de l'exine.....	- 17 -
1.1. Métabolisme des acides gras et précurseurs de la paroi pollinique.....	- 17 -
1.1.1. La biosynthèse des acides gras chez les plantes.....	- 17 -
1.1.2. Les précurseurs lipidiques de la sporopollénine.....	- 18 -
1.2. Métabolisme des phénylpropanoïdes et précurseurs de la paroi pollinique.....	- 19 -
1.2.1. La biosynthèse des acides aminés aromatiques.....	- 19 -
1.2.2. Les précurseurs phénoliques de la sporopollénine.....	- 19 -
2. La compartimentation des voies métaboliques.....	- 21 -
2.1. La compartimentation membranaire.....	- 21 -
2.2. Les métabolons.....	- 22 -
3. Les polymères des parois cellulaires végétales	- 23 -
3.1. La lignine.....	- 24 -
3.1.1. Localisation et fonctions.....	- 24 -
3.1.2. Nature des monomères.....	- 25 -
3.1.3. Stockage et transport des monolignols.....	- 25 -
3.1.4. Polymérisation des monolignols.....	- 25 -
3.1.5. Les liaisons chimiques au sein du polymère.....	- 26 -
3.2. La cuticule.....	- 26 -
3.2.1. Localisation et fonctions.....	- 26 -
3.2.2. Composition et nature des monomères.....	- 27 -
3.2.3. Stockage et transport des dérivés d'acide gras.....	- 27 -
3.2.4. Polymérisation des dérivés d'acides gras.....	- 28 -
3.2.5. Les liaisons chimiques au sein du polymère.....	- 29 -
3.3. La subérine.....	- 29 -
3.3.1. Localisation et fonctions.....	- 29 -
3.3.2. Composition et nature des monomères.....	- 29 -

3.3.3. Stockage/transport des monomères	- 30 -
3.3.4. Polymérisation des monomères	- 30 -
3.3.5. Les liaisons chimiques au sein du polymère.....	- 30 -
3.4. L'exine.....	- 31 -
3.4.1. Localisation et fonctions.....	- 31 -
3.4.2. Composition et nature des monomères.....	- 31 -
3.4.3. Stockage/transport des monomères	- 34 -
3.4.4. Polymérisation des monomères	- 36 -
3.4.5. Les liaisons chimiques au sein du polymère.....	- 36 -
3.5. Le manteau pollinique	- 36 -
3.5.1. Nature et fonction des composants.....	- 36 -
3.5.2. Stockage et transport des constituants	- 37 -
3.5.3. Biogénèse du manteau et liaisons.....	- 38 -
3.6. Spécificités du polymère de sporopolléine	- 38 -
MATERIELS ET METHODES	- 40 -
I. Méthodes de clonages de l'ADN	- 41 -
1. Préparation de l'ADN en vue d'un clonage	- 41 -
1.1. Amplification des fragments d'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR).....	- 41 -
1.2. Purification phénol/chloroforme du fragment de PCR.....	- 42 -
1.3. Digestion de l'ADN par des endonucléases de restriction et déphosphorylation du vecteur	- 42 -
1.4. Analyse des fragments d'ADN digérés sur gel d'agarose et purification	- 43 -
1.5. Ligation rapide de l'insert et du vecteur	- 43 -
1.6. Séquençage d'ADN	- 43 -
2. Souches bactériennes et de levures	- 44 -
2.1. <i>E. coli</i> DH5 α	- 44 -
2.2. <i>E. coli</i> BL21-G612	- 44 -
2.3. <i>A. tumefaciens</i> LB4404::pMP90.....	- 44 -
2.4. <i>S. cerevisiae</i> AH109	- 45 -
3. Vecteurs.....	- 45 -
3.1. Vecteur de sous-clonage	- 45 -
3.2. Vecteur d'expression chez <i>E. coli</i>	- 45 -
3.3. Vecteur d'étude du promoteur	- 46 -
3.4. Vecteurs pour l'hybridation <i>in situ</i>	- 46 -
3.5. Vecteurs de double hybride	- 46 -
3.6. Vecteurs d'expression de protéines en fusion avec un fluorochrome chez <i>Nicotiana benthamiana</i>	- 47 -
4. Amorces utilisées	- 47 -
II. Méthodes de transformation génétique.....	- 48 -
1. Transformations bactériennes	- 48 -
1.1. Transformation par choc thermique.....	- 48 -
1.2. Transformation par électroporation	- 49 -
2. Transformation stable d'<i>Arabidopsis</i>.....	- 49 -
3. Transformation de levures	- 50 -
4. Transformation de <i>Nicotiana benthamiana</i> par agroinfiltration	- 51 -
III. Matériel végétal et conditions de culture.....	- 52 -

1. <i>Arabidopsis thaliana</i>	- 52 -
2. <i>Brassica napus</i>	- 53 -
3. <i>Nicotiana benthamiana</i>	- 53 -
IV. Analyse et caractérisation de lignées d'insertion T-DNA	- 53 -
1. Extraction d'ADN génomique rapide.....	- 54 -
2. Génotypage par PCR	- 54 -
3. Vérification de la perte d'expression des gènes d'intérêt	- 55 -
3.1. Extraction d'ARN totaux.....	- 55 -
3.2. RT-PCR semi-quantitative.....	- 55 -
V. Extraction et analyses métaboliques	- 56 -
1. Extraction de polykétides	- 56 -
2. Extraction d'esters de CoA d'acides gras solubles et d'acides gras	- 56 -
3. Analyse et caractérisation de métabolites lipidiques par chromatographie liquide-spectrométrie de masse (LC-MS/MS)	- 57 -
VI. Analyses du pollen	- 58 -
1. Préparation de pollen.....	- 58 -
2. Coloration à l'Auramine-O	- 58 -
3. Microscopie électronique à transmission	- 58 -
4. Microscopie électronique à balayage.....	- 59 -
5. Germination du pollen <i>in vitro</i>	- 59 -
6. Germination <i>in vivo</i> du pollen, coloration du pistil à l'Aniline.....	- 60 -
7. Coloration d'Alexander	- 60 -
VII. Histologie	- 60 -
1. Coloration GUS	- 60 -
2. Immunocytochimie.....	- 60 -
3. Fractionnement subcellulaire d'extraits d'étamines de <i>Brassica napus</i>	- 62 -
VIII. Production de protéines recombinantes	- 62 -
1. Obtention de la séquence codante et clonage dans le vecteur d'expression.....	- 63 -
2. Production hétérologue de la protéine par <i>E. coli</i>	- 63 -
IX. Activités enzymatiques	- 64 -
1. Conditions d'incubation	- 64 -
2. Analyse des produits de réaction	- 65 -
X. Analyses des protéines	- 65 -
1. Extraction de protéines à partir de matériel végétal.....	- 65 -
2. Séparation des protéines sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)	- 66 -
3. Révélation des protéines au bleu de Coomassie.....	- 66 -
4. Transfert et immunodétection des protéines (western blot).....	- 66 -
5. Obtention d'anticorps spécifiques	- 67 -
XI. Tests d'interaction protéine-protéine	- 67 -
1. Test <i>in vitro</i> par HIS-Pull-down.....	- 67 -
2. Test <i>in vivo</i> par système double-hybride	- 68 -
3. Test d'interaction <i>in vivo</i> par l'utilisation de FLIM-FRET	- 69 -
RESULTATS	- 70 -

I. Caractérisation fonctionnelle de gènes impliqués dans le développement du pollen chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	- 71 -
1. Contexte du projet de recherche	- 71 -
1.1. Stratégie de recherche.....	- 71 -
1.2. Sélection de gènes candidats	- 72 -
2. Résumé des principaux résultats publiés	- 73 -
2.1. Identification de polykétides synthétases et tetrakétide α -pyrone réductases intervenant dans la synthèse de la paroi pollinique.....	- 73 -
2.2. Activités enzymatiques des protéines recombinantes PKSA, PKSB, TKPR1 et TKPR2.....	- 74 -
2.3. Les protéines PKSA, PKSB et TKPR1 sont associées au réticulum endoplasmique, TKPR2 est cytoplasmique.....	- 75 -
2.4. Les gènes <i>PKSA</i> , <i>PKSB</i> , <i>TKPR1</i> et <i>TKPR2</i> constituent une voie de biosynthèse conservée au cours de l'évolution	- 75 -
2.5. Certains grains de pollen mutants <i>pksa</i> , <i>pkbs</i> , <i>tkpr1</i> et <i>tkpr2</i> sont viables	- 126 -
II. Les enzymes intervenant dans la synthèse de sporopollénine forment un métabolite associé au RE	- 126 -
1. Contexte du projet de recherche	- 126 -
2. Résultats	- 128 -
2.1. Plusieurs enzymes de la voie de biosynthèse sont localisés au niveau du réticulum endoplasmique.....	- 128 -
2.2. Les enzymes de la voie métabolique forment un métabolite.....	- 129 -
2.2.1. Caractérisation in vitro de l'interaction entre protéines par HIS pull-down	- 129 -
2.2.2. Mise en évidence d'interactions protéiques in vivo par test double hybride dans la levure	- 130 -
2.2.3. L'analyse par FLIM-FRET montre que les protéines de la voie métaboliques interagissent à proximité du RE	- 131 -
2.3. Résultats complémentaires	- 133 -
2.3.1. Les interactions au sein du métabolite sont faibles	- 133 -
2.3.2. Analyses des profils métaboliques des mutants.....	- 135 -
III. Contribution à l'identification d'autres acteurs intervenant dans la synthèse de la paroi pollinique	- 137 -
1. Caractérisation de nouvelles lignées mutantes présentant des défauts de synthèse de l'exine	- 137 -
2. Etude fonctionnelle des gènes <i>At1g03390</i>, <i>At3g11980</i>, <i>At3g42960</i>, <i>At3g59530</i> et <i>At4g20420</i>	- 138 -
3. Localisation subcellulaire des gènes candidats	- 138 -
4. Etude de l'implication des protéines <i>ATA1</i> et <i>ATF1</i> dans la formation de la paroi pollinique	- 139 -
4.1. Caractérisation de l'expression spatiotemporelle des gènes <i>ATF1</i> et <i>ATA1</i>	- 139 -
4.2. Quelques éléments sur les activités enzymatiques des protéines recombinantes	- 140 -
DISCUSSIONS ET PERSPECTIVES	- 143 -
BIBLIOGRAPHIE	- 159 -

Abréviations

4CL : 4-coumarate-CoA Ligase
ACOS5 : acyl-CoA synthetase 5
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
ADNg : ADN génomique
ARN : acide ribonucléique
ARNm : ARN messenger
ARNt : ARN de transfert
ATA 1: arabidopsis tapetum1
ATF 1: acyltransférase 1
A.thaliana : *Arabidopsis thaliana*
ATP : adénosine triphosphate
BAHD : famille d'acyltransférases dépendantes du CoA
BET : bromure d'éthidium
BSA : « bovine serum albumin »
C4H : cinnamate 4-hydroxylase
CHS : chalcone synthase
CoA : coenzyme A
CoASH : coenzyme A réduit
Col-0 : Columbia-0
COMT : caféate O-méthyltransférase
cpm : coup par minute
CYP703A2, 704B1: Enzyme à co-facteur cytochrome p450
Da: dalton
DFR : dihydroxyflavonol 4-réductase
DMSO : diméthylsulfoxyde
DNase : désoxyribonucléase
dNTP : 2'-désoxyribonucléoside 5'-triphosphate
DRL: dihydroflavonol 4-reductase family protein
DO : densité optique
dpi : jours après infection (days post-inoculation)
DTT : dithiothréitol
E. coli : *Escherichia coli*
EDTA : éthylène diamine tétra-acétate
eGFP : « enhanced green fluorescent protein »
ESI : ionisation par électrospray
FLIM : fluorescence lifetime imaging microscopy
FRET : fluorescence/förster resonance energy transfer
g : force d'accélération centrifuge
G : gaïacyle
GST : glutathion S-transférase
GUS : β -glucuronidase
h : heure
H : p-hydroxyphényle
HisTag : motif de 6 histidines
IPTG : isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
KO: knock-out
LB : Luria Broth

LC-MS/MS : chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse triple quadrupole (liquid chromatography-tandem mass spectrometry)
LCR : leucoanthocyanidine 4-réductase
min : minute
mbar : millibar
MS2 : male sterility 2
NADPH: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
nm : nanomètre
PAGE : électrophorèse sur gel polyacrylamide
PAL : phénylalanine ammoniac lyase
PBS : tampon phosphate salin
PCR : « polymerase chain reaction »
PKS : polykétides synthase
psi : pound per square inch (unités de pression)
PTGS : « post-transcriptional gene silencing »
RE : réticulum endoplasmique
RFP : red fluorescent protein
RMN : résonance magnétique nucléaire
RNAi : « RNA interference »
RNase : ribonucléase
RT : transcription réverse
S : syringyle
SAD : sinapoyl alcool déshydrogénase
SDS : dodécylsulfate de sodium
SHT: spermidine hydroxycinnamoyl transferase
SIR: single ion recording
siRNA : « small interference RNA »
SSL : strictosidine synthase like protein
STS : stilbène synthase
T-DNA : ADN de transfère
TAE : tampon tris-acétate/EDTA
TBE : tampon tris-borate/EDTA
TEM : microscope électronique à transmission
TKPR : tetraketide α -pyrone reductase
TPS : tapetum specific protein
U : unité enzymatique
UV : ultra violet
V, kV : volt, kilovolt
WT : « wild type »
% : pourcentage
°C : degrés Celsius

INTRODUCTION

I. Développement de la fleur et du pollen

1. Préambule

Au cours de l'évolution, les espèces ont été obligées de s'adapter pour survivre sous peine de disparaître. La pression sélective s'exerce sur des populations d'organismes et à chaque génération, des variations génétiques apparaissent et peuvent conférer un avantage à un individu par rapport à ses congénères. Celui-ci aura alors plus de chance de se reproduire et de perpétuer son génome. Au fil des générations, cette modification génétique s'installera dans l'ensemble de l'espèce.

Les plantes sont des organismes photosynthétiques qui ne peuvent se déplacer pour échapper aux stress environnementaux. Pour se défendre, se protéger des fluctuations de l'environnement tout en laissant passer les rayons lumineux, contrôler les échanges avec celui-ci, contenir la pression osmotique interne tout en permettant la croissance et prolifération des cellules, elles ont acquis des barrières de protection complexes. Différentes parois assurent ces fonctions en recouvrant la totalité de la plante et assurant ainsi la première ligne de défense de la plante. Leur composition est fonction de leur fonction et celle protégeant le grain de pollen est particulière. En effet, pour assurer la fécondation et la reproduction, les grains de pollen sont libérés dans le milieu extérieur pour être transportés par le vent ou des organismes pollinisateurs. Avant d'atteindre le pistil d'une fleur de la même espèce ils seront exposés à la déshydratation, aux rayons UVs, à des organismes pathogènes et diverses variations de température. Pour se protéger, le pollen possède une coque protectrice aux propriétés de résistance à la dégradation chimique et mécanique exceptionnelles. Cette paroi, qui n'est pas dégradée après pollinisation, peut par exemple être retrouvée dans des strates terrestres datées de plusieurs milliers d'années. Ces caractéristiques uniques expliquent pourquoi la connaissance de sa composition et structure est restée fragmentaire car la dégradation chimique ménagée est impossible. Ces dernières années, l'essor de la biologie moléculaire et de la métabolomique a ouvert de nouvelles pistes d'étude et j'ai exploité ces outils au cours de mon travail de thèse pour étudier la formation de cette paroi d'un point de vue cellulaire, subcellulaire et métabolique.

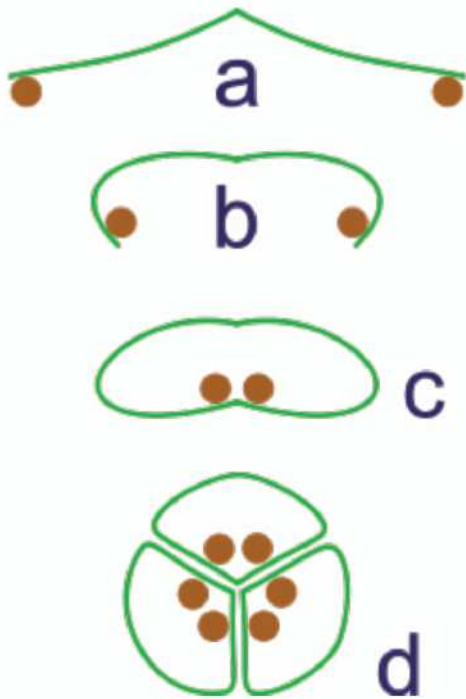


Figure I.1 L'évolution des carpelles.

Le carpelle correspond à l'élément de la fleur portant les ovules et formant, seul ou soudé à d'autres carpelles, le pistil chez les angiospermes. L'hypothèse de son apparition est ici retracée à partir de l'étude de fossiles retrouvés.

a : des sporanges apparaissent à l'extrémité des feuilles

b : les feuilles s'enroulent pour protéger les sporanges

c : un espace clos est formé par la soudure des feuilles enroulées

d : plusieurs rouleaux se regroupent pour former un syncarpe

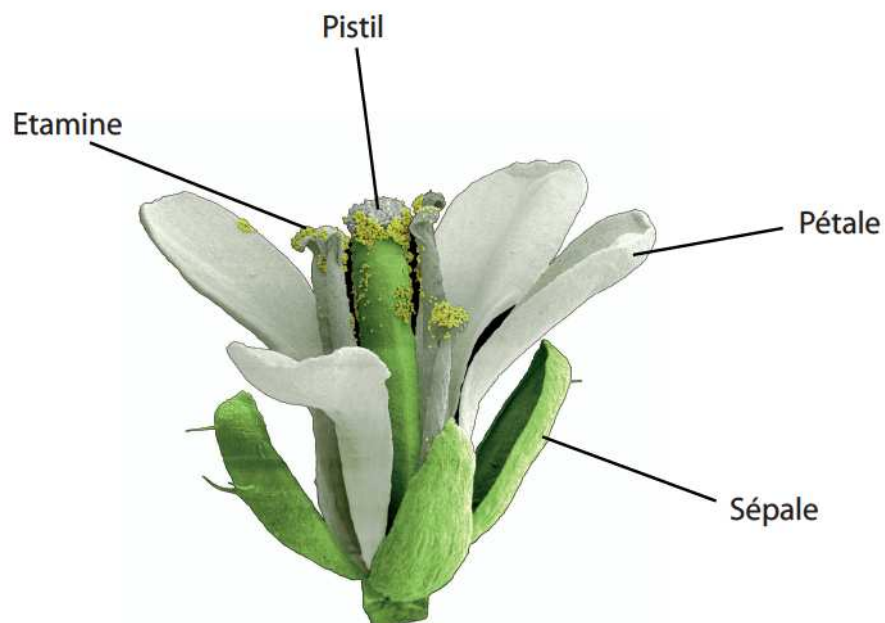


Figure I.2 Photographie d'une fleur d'*Arabidopsis thaliana*.

Les principales pièces florales sont ici annotées.

Cette représentation a été obtenue à partir d'une photographie au microscope électronique à balayage et une coloration artificielle (www.abcam.com).

2. Du développement floral au grain de pollen

2.1. Origine évolutive des fleurs

Chez les végétaux, la reproduction sexuée est caractérisée par l'alternance d'une phase diploïde et d'une autre haploïde. Lors de la méiose, les individus diploïdes, ou sporophytes, produisent des spores haploïdes, ou gamétophytes qui sont à l'origine des gamètes. L'union de deux gamètes mâle et femelle lors de la fécondation, redonne naissance à un zygote diploïde différent des deux sporophytes parents.

Chez les angiospermes ou plantes à fleurs, le gamétophyte mâle est le grain de pollen et les ovules constituent les gamétophytes femelles. D'abord contenus au sein de sporanges mâles ou femelles aux extrémités des feuilles et donc sujets aux agressions extérieures chez les végétaux inférieurs, la protection des gamètes a été améliorée au cours de l'évolution (figure I.1). D'après les fossiles retrouvés (amborellacées), ce sont les feuilles, qui, en se refermant sur elles-mêmes ont d'abord abrité les tissus reproducteurs. Puis, les sporanges mâles et femelles ont donné naissance aux étamines et carpelles et de nouvelles pièces florales sont apparues (pétales, sépales) jusqu'à évoluer vers les fleurs actuelles (figure I.2).

2.2. La formation des fleurs

2.2.1. Description anatomique

Chez la plupart des espèces végétales, l'ensemble des processus donnant naissance à une fleur est coordonné séquentiellement pour ne durer que quelques semaines. A la différence des animaux, chez lesquels une lignée cellulaire spécialisée dans la production de gamètes se développe précocement durant l'embryogénèse, les plantes ne produisent leurs organes reproducteurs que bien après l'embryogénèse (Boavida et al., 2005).

Chez les angiospermes, groupe dominant au sein des plantes terrestres, la plupart des organes dérivent de méristèmes, qui sont des populations de cellules indifférenciées. Les tissus méristématiques se divisent afin de fournir d'une part des cellules capables de se différencier pour former les primordia de tissus, et d'autre part pour renouveler ou maintenir une population stable de cellules méristématiques (Scott et al., 2004). Le développement des organes reproducteurs, abrités dans les fleurs, ne déroge pas à la règle et constitue un changement physiologique radical (Ma, 2005). Pour que le développement d'une fleur soit

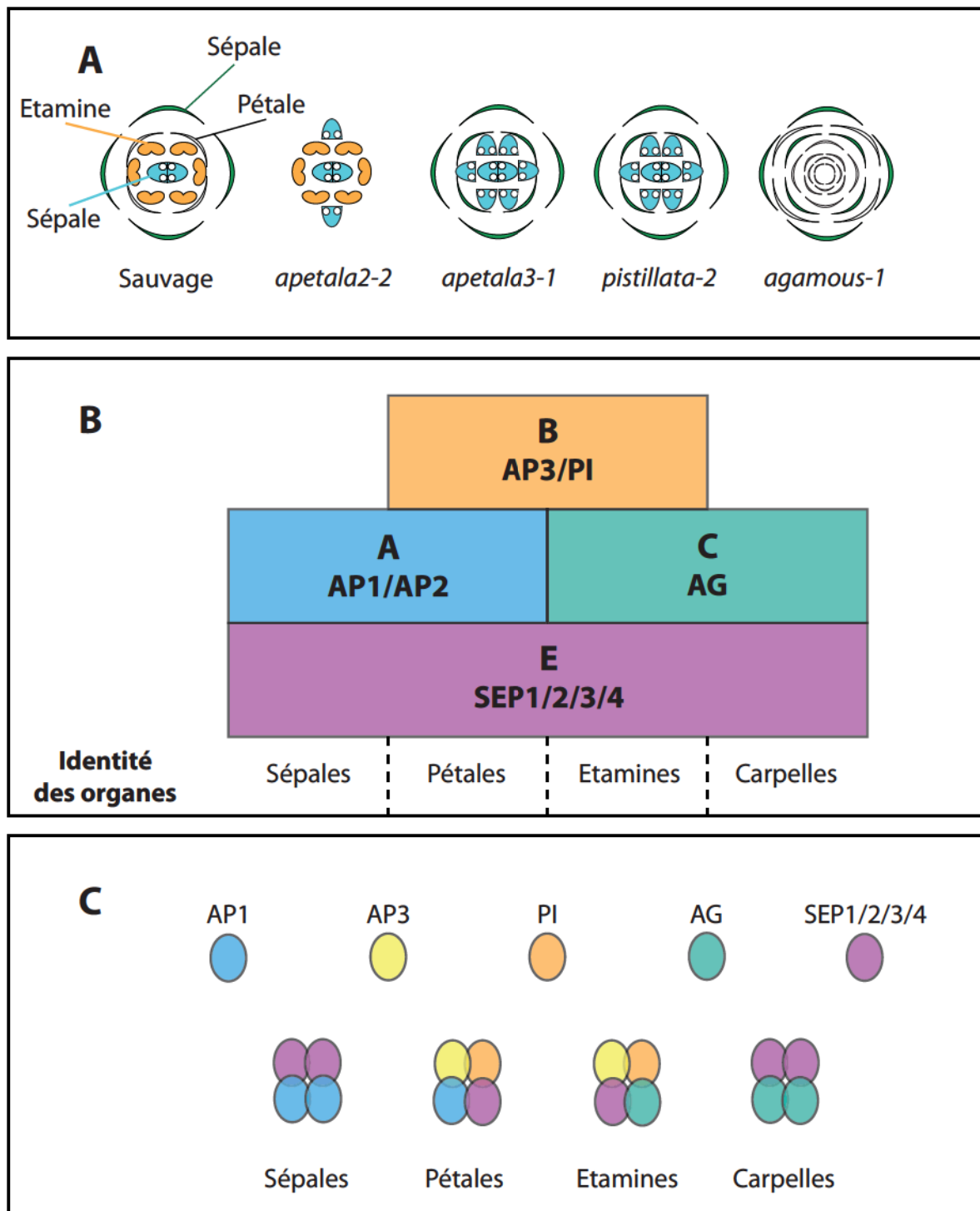


Figure I.3 Le modèle ABC du développement floral.

A. La mutation de 4 gènes principaux du développement floral conduit à des transformations homéotiques (changement d'identité d'un organe).

apetala2-2; remplacement des sépales et pétales par des carpelles. Des étamines remplacent parfois les pétales. *pistillata-2* et *apetala3-1*; Les sépales remplacent les pétales et les carpelles remplacent les étamines. *agamous-1*; Les étamines sont remplacées par des pétales et le gynécée par une seconde fleur.

B. Les fonctions des trois familles de gènes sont symbolisées par des boîtes contenant les gènes identifiés chez *Arabidopsis*. L'identité des organes formés est notée sous les familles de gènes qui y jouent un rôle (d'après Ma et al., 2005).

C. Modèle quartet pour associer l'interaction entre les acteurs protéiques et leur rôle dans le déterminisme floral. Les domaines MADS des protéines des familles A, B, C, D et E sont ici symbolisés par des ovales de différentes couleurs. L'identité de chaque organe floral serait déterminée par l'association des différents acteurs sous forme de tétramères (Theissen et al., 2001).

induit, l'appareil végétatif doit avoir atteint un stade de développement suffisant pour que le ratio entre organes reproducteurs et végétatifs permette d'éviter des compétitions vis à vis des substances nutritives. L'induction florale est également contrôlée par différents facteurs environnementaux comme la lumière, la température (Heo and Sung, 2011) et l'accès aux nutriments, en combinaison avec des signaux internes comme la présence de gibbérelline (Aya et al., 2009), d'auxine (Krizek, 2011), de cytokine (Bartrina et al., 2011) ou d'autres oscillateurs circadiens. L'intégration de ces signaux permet alors l'activation de gènes qui vont faire changer l'identité du méristème apical en méristème floral (Boavida et al., 2005). La plante passe ainsi d'un mode de développement végétatif, où la croissance dépendait de l'activité de division puis de différenciation des cellules du méristème apical, à un développement reproductif.

2.2.2. Les gènes contrôlant le développement des fleurs

L'ensemble des gènes impliqués dans le développement floral à été classé en trois grandes familles de gènes nommées A, B et C (figure I.3). C'est la découverte de mutants ayant des organes floraux modifiés qui a abouti à la proposition du modèle ABC comme régisseur du développement floral (Ma, 2005). Chez *Arabidopsis*, la fonction A est apportée par les gènes *APETALA1* et *2* (*AP1*, *AP2*) et leur mutation entraîne le remplacement des sépales et pétales par des carpelles ou étamines (figure I.3A). La fonction B est apportée par les gènes *APETALA3* (*AP3*) et *PISTILATA* (*PI*) et le gène *AGAMOUS* (*AG*) est essentiel à la fonction C. Des études ont montré que *AP3*, *PI* et *AG* sont initialement exprimés dans les régions du méristème floral qui vont former les primordia d'étamines puis leur expression se restreint aux primordia d'étamines et aux étamines en développement. La perte de leur fonction entraîne des défauts de développement de l'étamine (figure I.3A) et leur sur-expression un développement ectopique de celles-ci. Ces trois familles de gènes sont donc nécessaires au développement de la fleur mais pas suffisantes car l'expression ectopique des gènes des familles A, B et C ne permet pas le développement d'organes floraux à partir de feuilles.

Récemment, les gènes *AGL2*, *4* et *9* (pour AG-like) ont été identifiés par des études de similarité de séquence (Ma, 2005). Les protéines correspondantes sont notamment capables d'interagir avec les protéines AG, PI et AP3. L'obtention d'un triple mutant dont les fleurs ne sont formées que de sépales a confirmé leur rôle dans la détermination des organes floraux. Les gènes ont ainsi été renommés *SEP1*, *SEP2* et *SEP3* (*SEPALLATA*). La preuve finale est

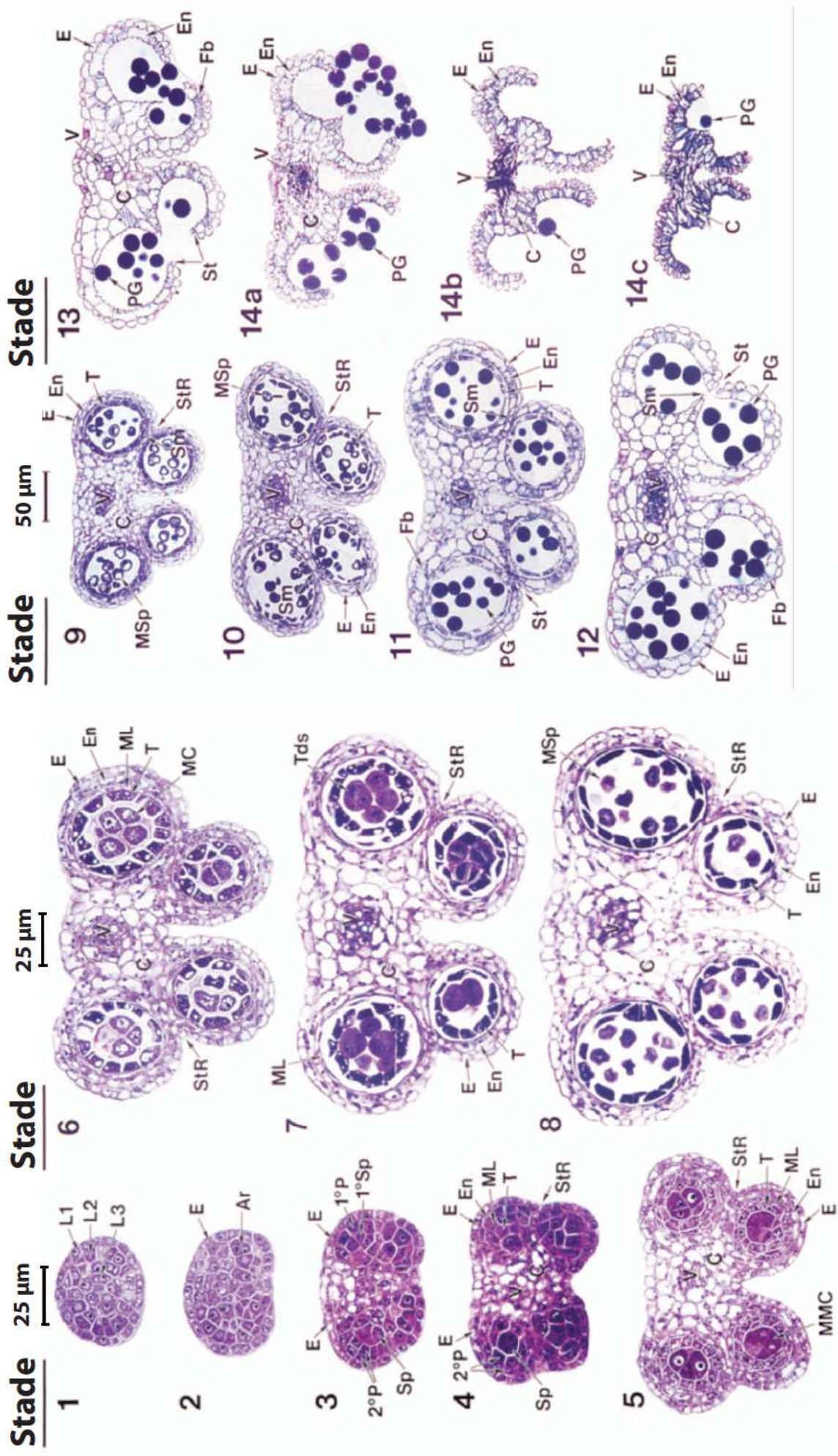


Figure 1.4 Echelle de développement de l'anthere chez *Arabidopsis thaliana* (Sanders et al., 1998).

Les bourgeons floraux ont été inclus dans une résine LR-White et découpés en sections de 1 µm puis colorées au bleu de toluidine. Les stades 1-8 représentent les phases de développement précoces de l'anthere et les stades 9-14c les phases tardives (déhiscence et sénescence). Ar : cellules archesporiales; C; tissu connectif; E, épiderme; En, endothécium; Fb, bande fibreuse; L1, L2, L3, les trois couches cellulaires des primordia d'étamines; MC, cellule méiotique; ML, couche moyenne; MMC, cellule mère du pollen; 1°P, couche pariétale primaire; 2°P, couche pariétale secondaire; 1°Sp couche sporogène primaire; Sp cellules sporogènes; Sm, septum; StR, région du stomium; T, tapetum; Tds, tétrades; V, région vasculaire.

venue par l'expression ectopique de *SEP3* et des gènes de la famille B et C qui a entraîné la conversion des feuilles en étamines. Finalement, une fonction redondante à celles des *AGL2*, *4* et *9* a été découverte pour le gène *AGL3* qui a en conséquence été renommé *SEP4*.

Le développement floral est donc régi par 4 familles de gènes (figure I.3B). A l'exception d'*AP2*, ces gènes ont un domaine MADS qui est fréquemment retrouvé dans différents facteurs de transcription et fait partie du domaine de fixation à l'ADN. Les protéines des familles ABC possèdent également des domaines K, I et C intervenant dans la formation d'homo- et hétérodimères de facteurs de transcription. Le modèle ABC a donc évolué vers un modèle quartet, où par exemple, l'apparition des étamines est expliquée par l'association sous forme de tétramère des protéines de la famille B, C et E (figure I.3C, Theissen and Saedler, 2001).

2.3. Le développement des étamines

2.3.1. Description anatomique

Le développement des étamines a été décrit en détail (Sanders et al., 1999). Il a été divisé en 2 phases principales subdivisées en 14 étapes selon des événements morphologiques, cellulaires et moléculaires (figure I.4). Avant le premier stade, le méristème floral se forme et croît. Des primordia de sépales puis de pétales et d'étamines apparaissent. Pendant les stades 1 à 5, les anthères adopteront leur forme caractéristique quadrilobée. Pour cela, des cellules archesporiales de chaque primordium vont par division et différenciation cellulaire former 4 lobes contenant 4 couches de cellules non reproductrices (de l'extérieur vers l'intérieur : l'épiderme, l'endothecium, la couche moyenne et le tapétum) encerclant un sac pollinique contenant des cellules sporogènes (ou cellules mères du pollen, CMP).

Lors des stades 6 et 7, les CMP entrent en méiose et forment des tétrades protégées par une paroi de callose alors que les quatre autres couches cellulaires acquièrent des fonctions de support, de nutrition ou se préparent à la déhiscence (Koltunow et al., 1990; Ma, 2005). Pendant ce temps, l'étamine est toujours en croissance et les cellules du tapétum sécrètent des callases permettant ainsi, lors du stade 8, la dissociation des cellules gamétophytiques entre elles et aussi de celles du tapétum. Ceci aboutit à la formation d'un locule ou loge pollinique, espace cerné par le tapétum où baigneront les gamètes jusqu'à la fin de leur développement.

Durant les stades 9 à 12, les microspores forment des grains de pollen matures, acquérant une partie de la paroi qui les protégera. Au cours des stades 10 et 11, le tapétum

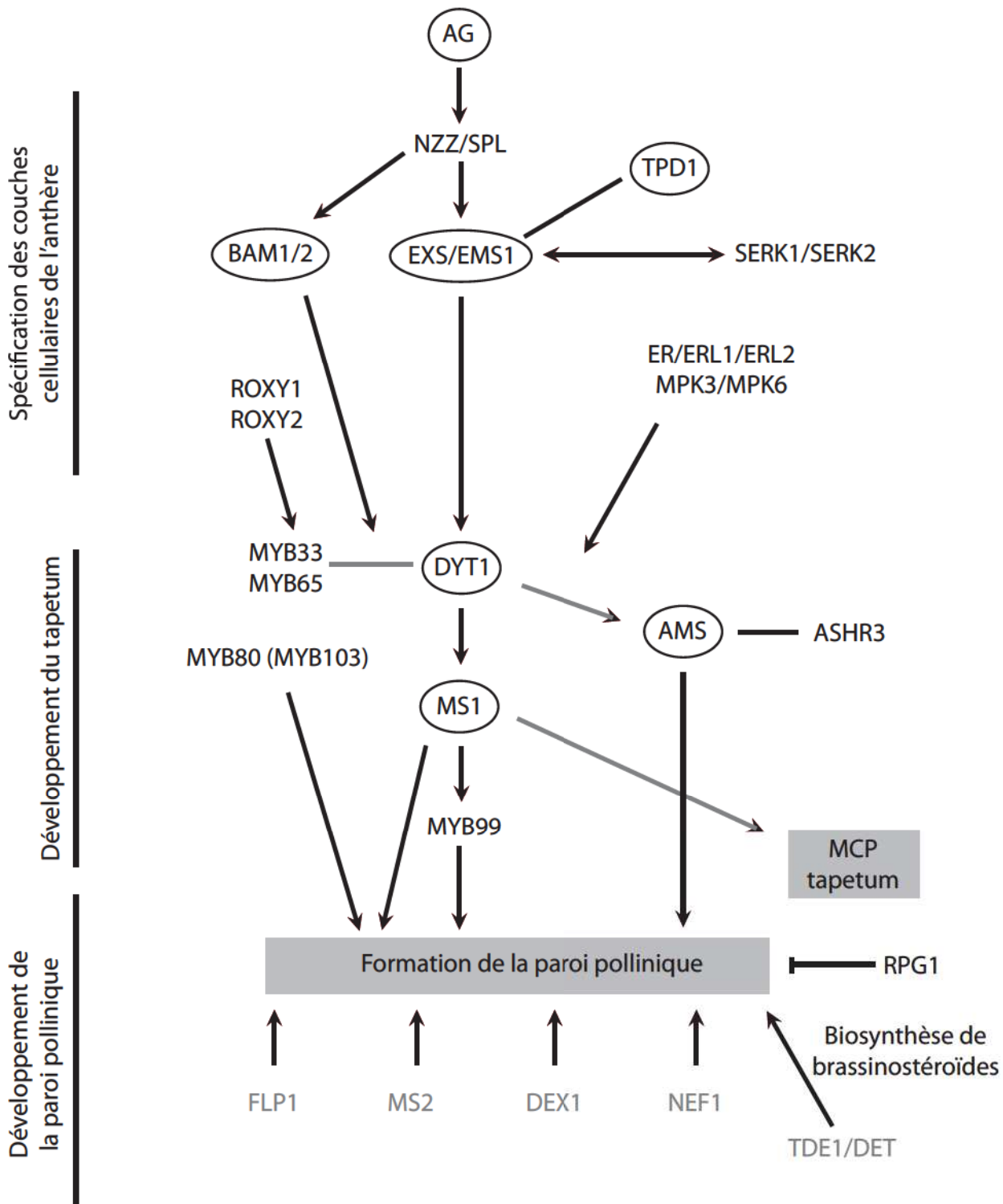


Figure I.5 Régulateurs de transcription impliqués dans le développement de la paroi pollinique.

La fonction des gènes est indiquée sur la gauche du schéma. Les flèches indiquent un rôle activateur, le symbole —| un effet inhibiteur.

AG, AGAMOUS; AMS, ABORTED MICROSPORE; BAM1, BARELY ANY MERISTEM 1; BAM2, BARELY ANY MERISTEM 2; DET, DE-ETIOLATED; DEX1, DEFECTIVE INEXINE PATTERNING 1; DYT1, DYSFUNCTIONAL TAPETUM 1; EXS/EMS1, EXTRA SPOROGENOUS CELLS/EXCESS MICROSPOROCYTES 1; FLP1, FACELESS POLLEN-1; MS1, MALE STERILITY 1; MS2, MALE STERILITY 2; MSP1, MULTIPLE SPOROCYTE1; NEF1, NO EXINE FORMATION 1; NZZ/SPL, NOZZLE/SPOROCYTELESS; RPG1, RUPTURED POLLEN GRAIN 1; SERK1, SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE 1; SERK2, SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE 2; TDE1, TRANSIENT DEFECTIVE EXINE 1; TDR, TAPETUM DEGENERATION RETARDATION; TPD1, TAPETAL DETERMINANT 1; UDT1, UNDEVELOPED TAPETUM 1. D'après Wilson et al., 2009

dégénère, relarguant les derniers composants participant à la formation de la paroi pollinique et terminant ainsi la maturation du pollen. Enfin, durant les stades 12 à 14 les autres couches cellulaires dégèrent, aboutissant à la déhiscence de l'anthere et, en conséquence, à la libération du pollen.

2.3.2. Les gènes contrôlant le développement des étamines

L'ensemble des régulateurs de transcription identifiés et impliqués dans le développement des étamines et la spécification des tissus qu'elles contiennent est remarquable. Les interactions entre ces récepteurs, ligands, kinases ou facteurs de transcription ont été résumées sous la forme d'un modèle que nous allons maintenant aborder brièvement (figure I.5, Wilson and Zhang, 2009). La fonction exacte de ces régulateurs est encore à l'étude (Phan et al., 2011).

2.3.2.1. Spécification des couches cellulaires de l'anthere

Une des étapes clefs de l'initiation de la sporogénèse dans les étamines et les carpelles est l'induction des facteurs de transcription NOZZLE/SPOROCYTELESS (NZZ/SPL) par AG. Ces protéines sont exprimées pendant la division des cellules archesporiales et permettent l'expression d'un récepteur kinase EXTRA SPOROGENOUS CELLS/EXCESS MICROSPOROCYTES1 (EXS/EMS1) qui régule la division de ces cellules. Chez le mutant *exs/ems1* ces cellules prolifèrent anormalement entraînant une multiplication des méiocytes et une perte des cellules du tapétum et de la couche moyenne (Canales et al., 2002; Zhao et al., 2002). Ce phénotype est retrouvé chez le mutant *tpd1* (*tapetal determinant1*) qui présente en plus un retard de dégénérescence du tapétum. Ce gène exprimé dans les microsporocytes code pour un ligand du récepteur EXS/EMS1. De façon intéressante, les microspores entrent en méiose malgré ces mutations, mais sont stoppées en cytotdiérèse (phase terminale de division dans le cycle cellulaire), indiquant que les cellules du tapétum jouent un rôle important dans les dernières étapes de la méiose. D'autres protéines kinases sont impliquées dans la différenciation cellulaire des cellules de l'étamine. Le tapétum, l'endothecium et la couche moyenne ne se développent pas chez le double mutant *bam1bam2* (*BARELY ANY MERISTEM*), alors que des cellules sporogènes semblables à des cellules mères du pollen se développent avant de dégénérer (Hord et al., 2006). Ces protéines semblent donc agir de

façon à réguler les divisions des cellules sporogènes en aidant à la différenciation cellulaire des cellules somatiques de l'anthere. Un phénotype et une fonction similaire ont été constatés pour les protéines SERK1 et SERK2 (Somatic Embryogenesis Receptor-Like Kinase 1/2 ; Albrecht et al., 2005; Colcombet et al., 2005).

Le développement des cellules du tapétum est également strictement contrôlé. La mutation des gènes *ER*, *ERL1*, *ERL2* et *MPK3*, *MPK6* entraîne un développement excessif des cellules du tapétum, sans que l'expression des gènes *EMS1* ou *TPD1*, par exemple, ne soit touchée (Mizuno et al., 2007). Ils constituent donc une partie d'une nouvelle voie de régulation de la différenciation cellulaire de l'anthere.

2.3.2.2. Développement du tapétum et formation de la paroi pollinique

Une fois les cellules du tapétum différenciées, d'autres facteurs de transcription sont responsables du bon fonctionnement de ces cellules. DYT1 apparaît être l'un des premiers acteurs. C'est un possible facteur de transcription du type bHLH agissant en aval de SPL/NZZ et EMS1/EXS, requis pour permettre l'expression de AMS et MS1 (Zhang et al., 2006). Il est fortement exprimé dans les cellules du tapétum lors des stades 5-6 du développement de l'anthere. Dans le locule du mutant *dyl1*, les microspores entrent en méiose, mais très peu terminent la cytodierèse. Les gènes *AMS* et *MS1* ne sont plus exprimés à la différence de *MYB33* et *MYB65*. DYT1 est donc nécessaire à la régulation de l'expression des gènes au sein des cellules du tapétum mais pas suffisant. D'ailleurs, sa surexpression ne permet pas de compléter le phénotype du double mutant *spl/nzz* (Zhang et al., 2006). *MYB33* et *MYB65* semblent impliqués dans le développement du tapétum. Le double mutant présente un tapétum hypertrophié qui entraîne la dégénérescence de grains de pollen avant la méiose. Mais en condition de forte luminosité ou faible température, la fertilité est augmentée par rapport au sauvage. Ces protéines sont donc probablement impliquées dans la régulation négative du développement des grains de pollen quand les conditions sont défavorables. AMS est également un facteur de transcription de type bHLH dont l'expression commence dans les cellules du tapétum juste avant la méiose. La perte de sa fonction entraîne une dégénérescence des cellules du tapétum et des microspores après la fin de la méiose.

Un autre régulateur transcriptionnel a été isolé à partir d'une mutagenèse EMS. Le criblage de cette banque de mutants a conduit à l'identification du gène *AtMYB103*

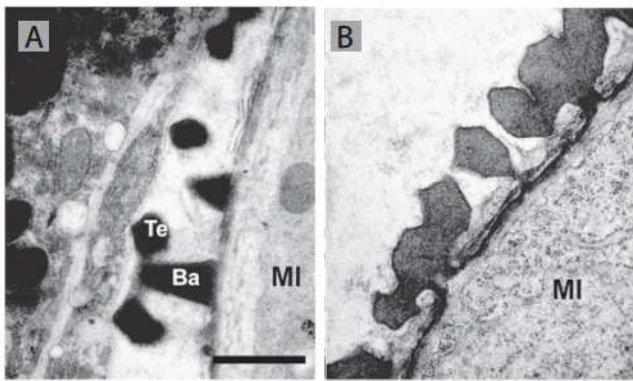


Figure 1.6 Analyse par microscopie électronique de l'impact de la mutation *ms1* sur la structure de l'exine.

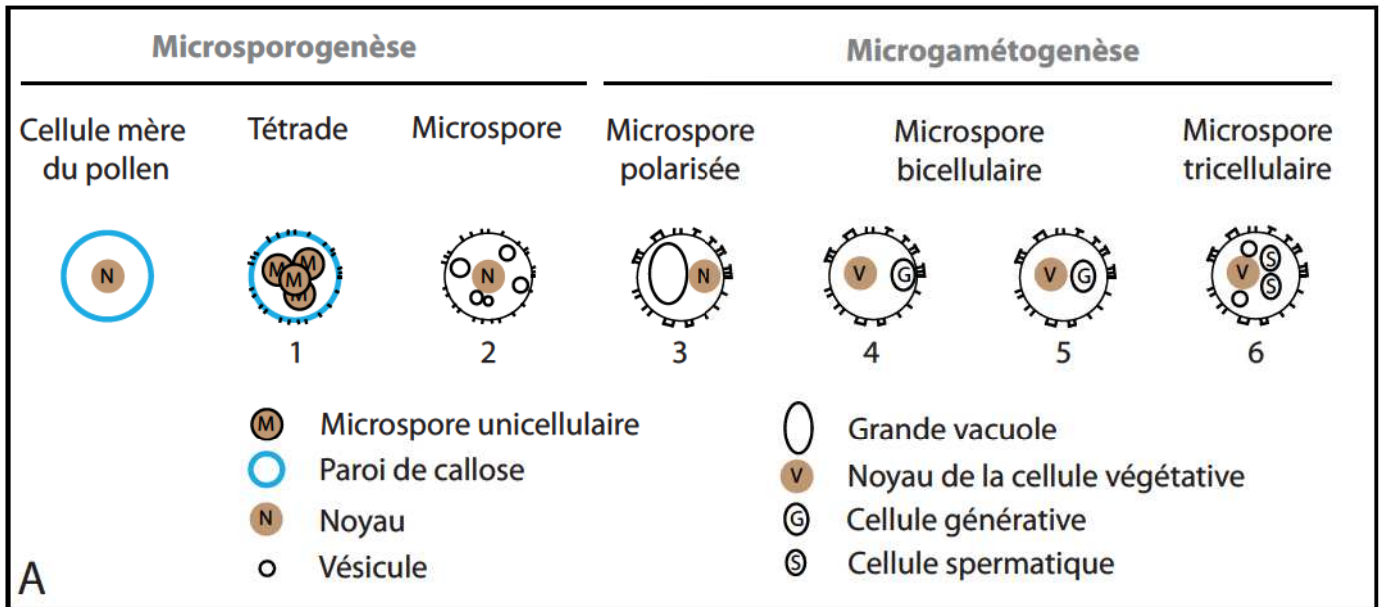
Après une inclusion dans de la résine LR white, les bourgeons ont été coupés et observés au microscope électronique à transmission. Ici sont représentés des coupes de grains de pollen issus d'une plante sauvage (A) ou du mutant *ms1* (B) au stade microspore. Ba, Baculae; Mi, microspore; Te; Tectum. D'après Ito et al., 2007.

dont la mutation entraîne une dégénérescence précoce du tapétum suivie de celle d'une grande majorité de microspores et en conséquence une stérilité mâle (Zhang et al., 2007). Seuls quelques grains dépourvus d'exine peuvent être observés dans l'anthere. L'analyse des données de micro-arrays du mutant révèle une perte d'expression de nombreux gènes impliqués dans la synthèse de l'exine comme MS2 confirmant ainsi que la protéine serait impliquée dans la régulation des gènes impliqués dans la synthèse de la paroi pollinique.

Un dernier régulateur critique du développement des cellules du tapétum et des microspores chez *Arabidopsis thaliana*, MS1, a été décrit lors de plusieurs études (Ito et al., 2007; Wilson et al., 2001; Yang et al., 2007). MS1 est une protéine exprimée de façon précise à partir de la destruction de la paroi de callose jusqu'au stade de microspore libre unicellulaire. L'accumulation de cette protéine serait régulée par un processus de protéolyse ubiquitine dépendante (Yang et al., 2007). La protéine contient des motifs caractéristiques d'un facteur de transcription et a une localisation nucléaire, un rôle de régulateur transcriptionnel a ainsi été suggéré (Ito et al., 2007). Chez le mutant *ms1*, le développement normal du tapétum est touché. La structure de l'exine et du manteau pollinique, la sécrétion de métabolites sont perturbées ainsi que la mort cellulaire programmée du tapétum le tout aboutissant à une stérilité mâle (figure I.6). L'analyse des données de micro-arrays de ce mutant *ms1* montre quant à elle que l'expression de 260 gènes, potentiellement associés à la formation de la paroi, présente un profil différent de celui obtenu pour une plante sauvage (Yang et al., 2007). Une recherche par similarité de séquence montre que ces gènes codent pour des facteurs de transcription (comme MYB99 par exemple) ou pour des enzymes intervenant dans le métabolisme lipidique et des phénylpropanoïdes. L'expression d'autres protéines classées comme des « lipid transfer protein » (LTP) et des oléosines est également touchée et pourrait expliquer la perturbation de l'activité de sécrétion des cellules du tapétum. Il apparaît ainsi que le facteur de transcription MS1 est impliqué dans la régulation de l'expression de gènes impliqués dans la synthèse de la sporopollénine et du manteau (Yang et al., 2007).

2.4. Le développement du pollen, gamétophyte mâle des végétaux

La formation du pollen peut être divisée en deux phases séquentielles, caractérisées par des modifications cytologiques importantes : la microsporogénèse et la



A

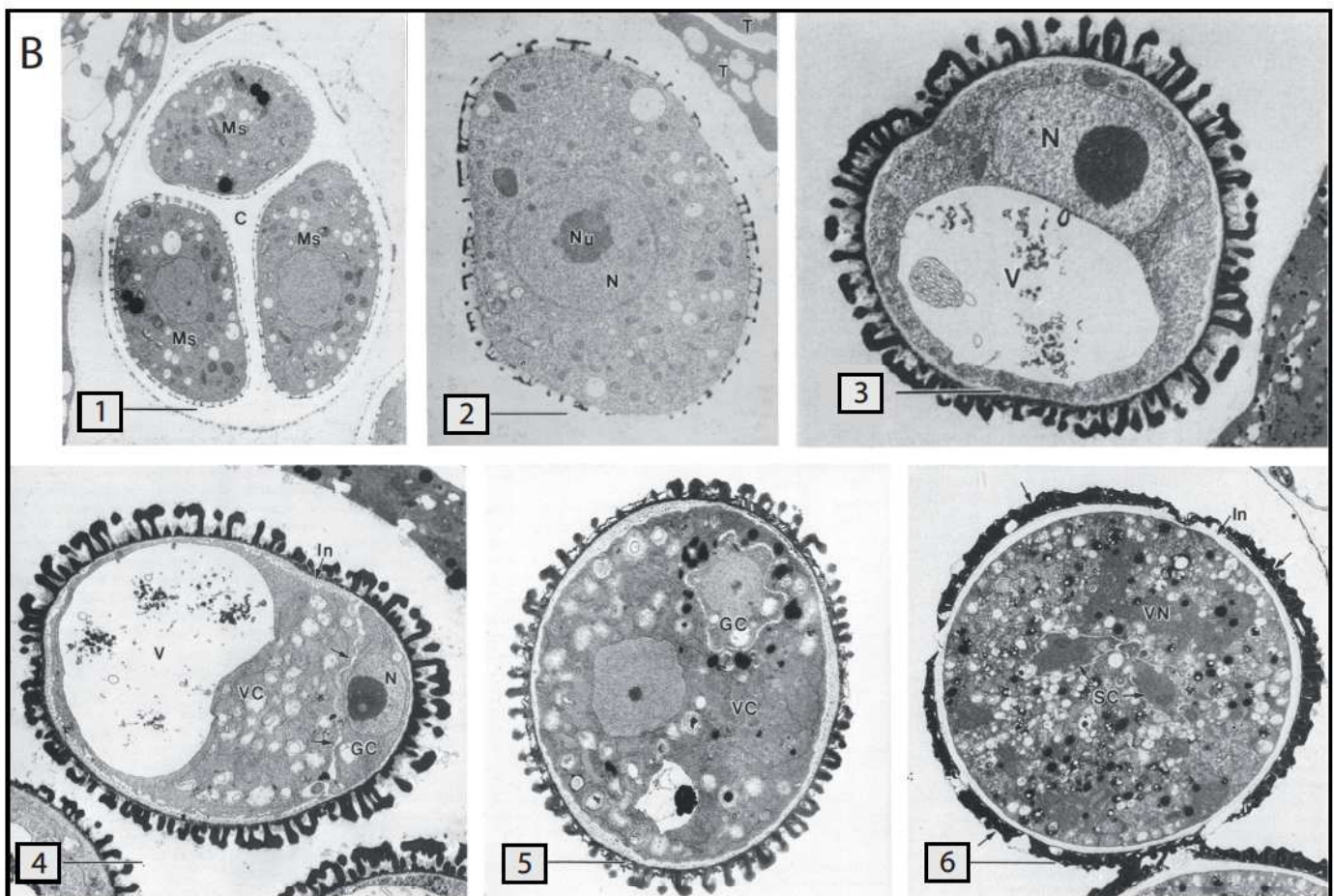


Figure I.7 Le développement du gamétophyte mâle chez *Arabidopsis thaliana* : microsporogénèse et microgamétogénèse.

Représentation schématique (A) et photographies de microscopie électronique à transmission (B) des différents stades morphologiques du développement du grain de pollen chez *Arabidopsis*.

Microsporogénèse : Les cellules mères du pollen entrent en division de méiose et forment une tétrade de microspores haploïdes encapsulées dans une paroi de callose. Leur individualisation en microspores marquera l'entrée en microgamétogénèse. Microgamétogénèse : La fusion des vésicules polarise la cellule et permet la formation d'une petite cellule générative incluse dans une grande cellule végétative au cours de la mitose pollinique I. La cellule générative de la microspore bicellulaire (ou binucléée) subira ensuite une mitose pollinique II pour former deux gamètes mâles identiques ou cellules spermatisques. Stade 1, tétrade; 2, microspore; 3, microspore polarisée; 4-5, microspore bicellulaire précoce et tardive; 6, microspore tricellulaire. D'après Borg et al., 2009 et Owen et Makaroff, 1994.

microgamétogenèse (figure. I.7). Elle commence avec la division des Cellules Mères du Pollen (CMP) et se termine avec la libération du pollen mature lors de la déhiscence de l'anthere (Owen and Makaroff, 1995).

La microsporogenèse débute par la transformation des CMP en microsporocytes. Après leur division, les plasmodesmes reliant les CMP s'élargissent. Une paroi imperméable de callose se dépose, le programme de transcription évolue, les plastes et mitochondries se différencient (figure I.7, stade 0). Il y a ainsi formation d'un syncytium synchronisé, isolé transitoirement des cellules du sporophyte avec un programme génétique réinitialisé permettant d'établir un programme génétique gamétophytique (Mackenzie et al., 1967; Scott et al., 2004). Cette paroi de callose pourrait aussi éviter la fusion entre les microsporocytes, mais sa fonction exacte reste discutée.

Puis débute la méiose. Deux divisions méiotiques transforment ainsi chaque microsporocyte en une tétrade de microspores qui développe chacune sa propre enveloppe de callose tout en restant enchâssée au sein de la paroi de callose du microsporocyte initial (figure I.7 stade 1). Les tétrades de microspores haploïdes se détachent du tapétum entraînant la formation du locule, puis se dissocient par rupture de la paroi de callose suite à l'action de callases provenant du tapétum (Boavida et al., 2005; McCormick, 1993). La biogénèse de la paroi pollinique commence également à ce stade et la primexine commence ainsi à se développer autour de chaque microspore (figure I.7 stade 2 ; Ma, 2005).

La fin de la dissolution de la tétrade marque l'entrée en microgamétogenèse. Les petites vacuoles de chaque microspore fusionnent (figure I.7 stade 3), ce qui a pour effet de polariser la majeure partie du cytoplasme d'un côté de la cellule et de retrouver le noyau de l'autre côté. Cette polarisation est à l'origine de la division asymétrique qui suit et qui est essentielle à la différenciation de deux cellules filles (figure I.7 stade 4 et 5) au rôle tout à fait différent : une grande cellule végétative nourricière et une petite cellule générative qui se divisera lors d'une 2^{ème} mitose en deux cellules spermatiques avant que le pollen ne soit libéré (cas chez 30% des espèces végétales, dont *Arabidopsis*), formant ainsi un pollen tricellulaire ou unité germinale mâle (figure I.7 stade 6). Au même moment, le tapétum dégénère, puis les grains de pollen se déshydratent jusqu'à ne plus contenir que 15-30% d'eau. Après la lignification du septum puis du stomium, l'anthere devient biloculaire et entre en déhiscence permettant aux gamétophytes mâles d'être libérés (Ma, 2005).

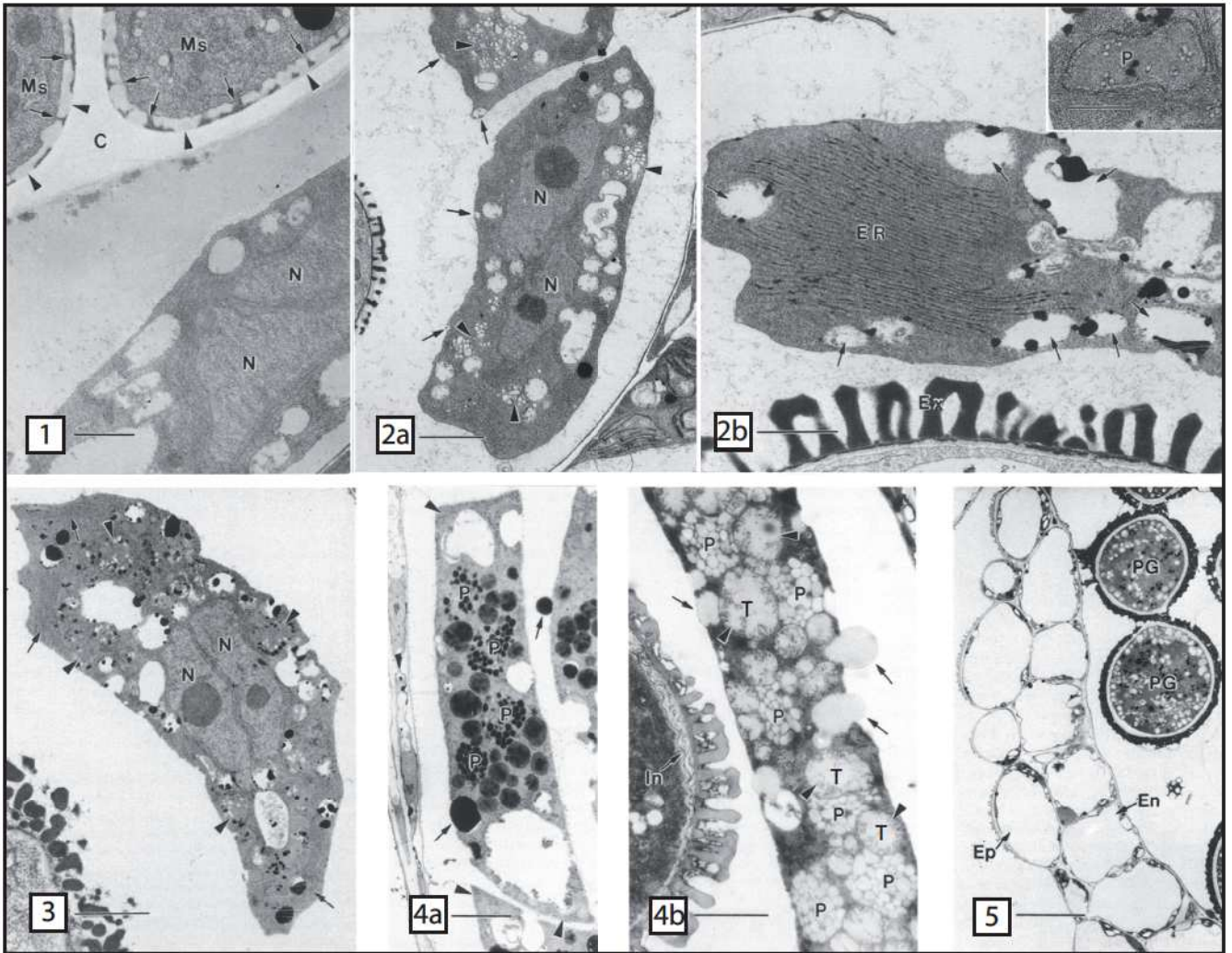


Figure I.8 Le développement des cellules du tapétum chez *Arabidopsis thaliana*.

Au cours du développement du gamétohyte mâle, l'organisation subcellulaire du tapétum évolue pour fournir les précurseurs indispensables à la formation de la paroi pollinique et à la constitution des réserves énergétiques du grain de pollen.

Lors de la méiose, les plasmodesmes ainsi que la paroi primaire des cellules du tapétum disparaissent. Ces cellules vont également subir un cycle d'endoréduplication, un réseau de réticulum endoplasmique dense et des vacuoles se forment (1). Après individualisation des microspores, de nombreuses vésicules sont visibles sous la surface membranaire des cellules du tapetum. Celles-ci semblent délivrer du matériel fibreux dans le locule (voir flèches images 2a et 2b). Au stade de microspore polarisée, le réseau de réticulum endoplasmique est toujours visible et forme des vésicules, les tapétosomes (flèches image 3). Les plastes, ici élaïoplastes (pointe de flèche image 3), contiennent des gouttelettes de matériel osmiophile ou transparent plus nombreuses et plus larges. Suite à la division asymétrique des microspores, les cellules du tapétum ont accumulé un nombre croissant de vésicules denses aux électrons qui semblent être relâchées dans le locule (flèche image 4a). Le ER, les tapétosomes et les élaïoplastes où s'accumulent des vésicules sont toujours présents, malgré l'aspect dégénéré du reste du cytoplasme (P image 4a). Les vésicules osmiophiles (pointe de flèche image 4b) et dépôts dans les plastes augmentent en taille et les vésicules du tapétum sont relargués dans le locule (flèches images 4b). Au stade de microspores tricellulaire, le processus de mort cellulaire programmé du tapétum est terminé et son contenu est déposé sur les grains de pollen matures. 1, stade tétrade; 2a, stade microspore libre précoce; 2b, stade microspore libre tardif; 3, stade microspore polarisée; 4a, stade microspore bicellulaire; 4b, stade microspore bicellulaire tardif; 5, stade microspore tricellulaire. En, Endothecium; Ep, epiderme; ER, réticulum endoplasmique; Ex, exine; Ms, microspores; N, noyau; P, élaïoplaste ; PG, grain de pollen mature; T, tapétosomes.

D'après Owen et Makaroff, 1994.

3. Le développement de la paroi pollinique

3.1. Acteurs cellulaires impliqués

Le développement de la paroi pollinique est étroitement lié au développement des microspores et à celui du tissu nourricier, le tapétum (Goldberg et al, 1993). Il a été constaté que l'expression d'une RNase sous le contrôle d'un promoteur spécifique du tapétum, en permettant la destruction sélective de ce tissu, entraînait de graves défauts de développement du pollen (Goldberg et al., 1995). En parallèle, il a été observé que la perte de fonction des facteurs de transcription MS1, AMS et AtMYB103, impliqués dans la régulation transcriptionnelle spécifique des cellules du tapétum, avait pour conséquence la dégénérescence des cellules du tapétum et, *de facto*, celle des grains de pollen (Higginson et al., 2003; Ito and Shinozaki, 2002; Ma, 2005; Sorensen et al., 2003; Wilson et al., 2001). Enfin, tout au long de la maturation des grains de pollen, la sécrétion, par le tapétum, de matériel plus ou moins dense aux électrons est visible en microscopie électronique.

Pour comprendre la biosynthèse de la paroi pollinique il est donc indispensable d'étudier en parallèle l'évolution de l'organisation subcellulaire des cellules du tapétum (figure I.8).

Pour fournir les précurseurs indispensables à la formation de la paroi pollinique et à la constitution des réserves énergétiques du grain de pollen, les cellules vont subir un cycle d'endoréplication, un réseau de réticulum endoplasmique dense et des vacuoles se forment. Pour faciliter l'excrétion des produits formés, la paroi primaire des cellules du tapétum disparaît (figure I.8.1). Après individualisation des microspores, les cellules du tapétum semblent délivrer du matériel fibreux dans le locule (flèches figure I.8.2a et 2b). Au stade de microspore polarisée, des plastes de réserves, élaïoplastes (pointe de flèche figure I.8.3) et des vésicules dérivant du réticulum se forment, les tapétosomes (flèches figure I.8.3). Des vésicules denses aux électrons se développent et sont libérées dans le locule suite à la division asymétrique des microspores (flèche figure I.8.4a). Plus tardivement, les élaïoplastes et tapétosomes sont relâchés (flèches figure I.8.4b). Au stade de microspore tricellulaire, le processus de mort cellulaire programmé du tapétum est terminé et son contenu est déposé sur les grains de pollen matures.

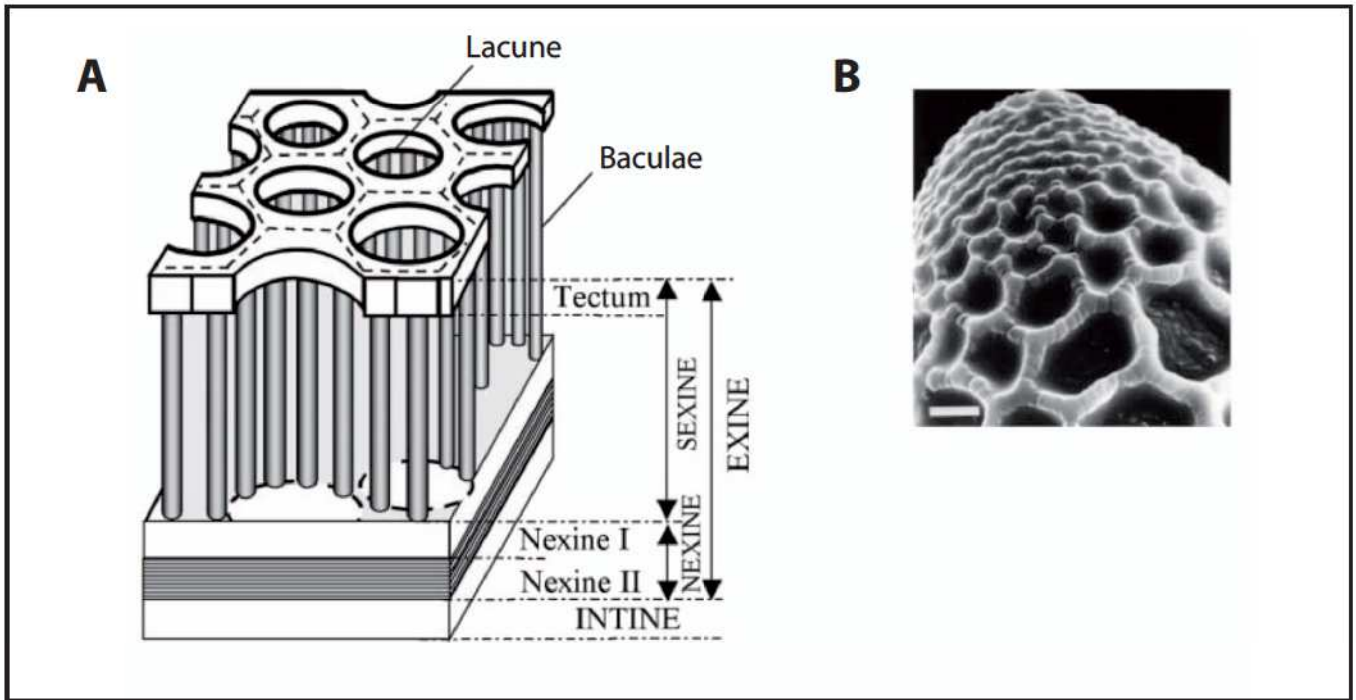


Figure I.9 Cinétique de formation de la paroi pollinique chez *Arabidopsis thaliana*.

A. Schéma de l'architecture générale de la paroi pollinique d'un grain de pollen mature d'*A. thaliana*.

B. Photographie en microscopie électronique à balayage de la paroi pollinique d'un grain de pollen d'*Arabidopsis thaliana*. Le réseau régulier et réticulé de l'exine formé par les baculae surmontées du tectum est ici visible. La barre représente 1 μm.

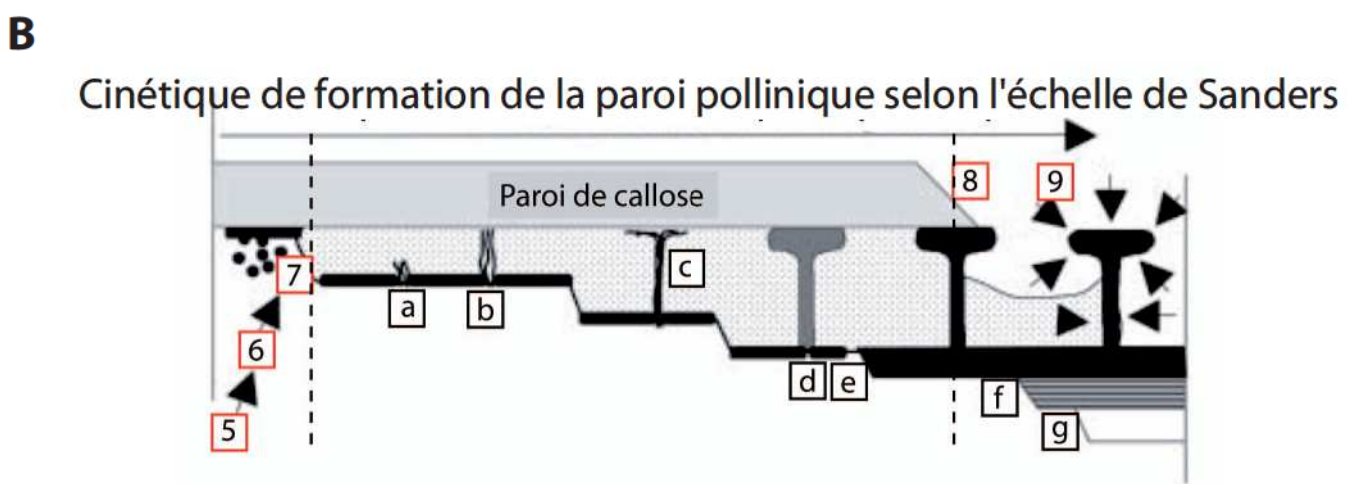
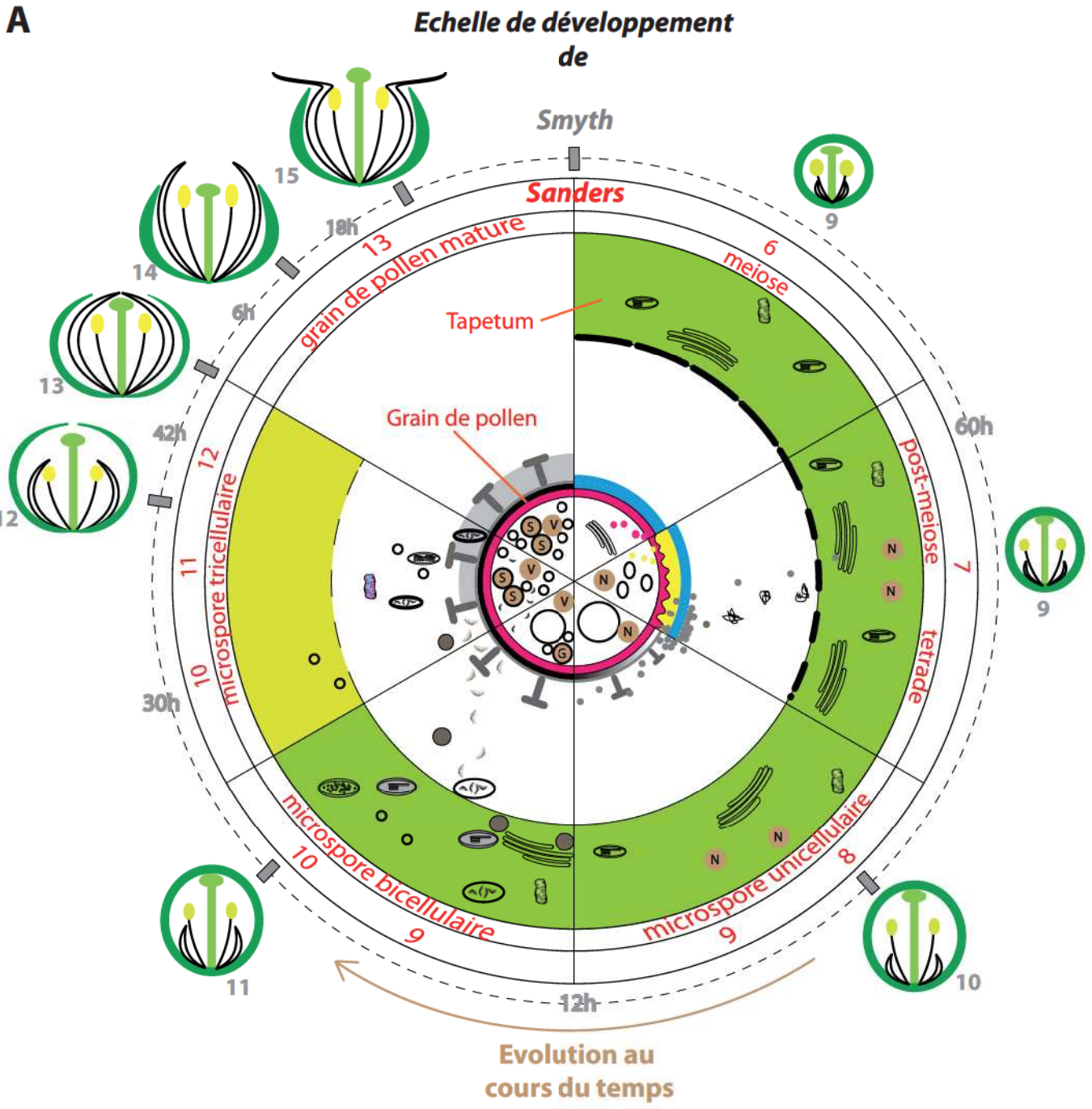
3.2. Cinétique de formation de la paroi pollinique

La paroi pollinique mature du grain de pollen est formée de 3 types majeurs de structures synthétisés en 6 jours seulement. A partir de la membrane plasmique vers l'extérieur, on trouve ainsi l'intine, l'exine et le manteau pollinique (figure I.9). Pour décrire la formation de la paroi pollinique, nous utiliserons l'échelle de développement de Sanders (Sanders et al., 1999).

La formation de l'exine débute juste après la méiose (stade 7 figure I.10) et se termine au moment de la première mitose pollinique (stade 10 figure I.10). Elle débute par la sécrétion d'une matrice cellulosique, la primexine par les tétrades de microspores (stade 7 figure I.10). Celle-ci s'accumule sous la forme d'une couche homogène entre la membrane plasmique et la paroi de callose, à l'exception du futur emplacement des pores germinatifs. En accompagnement d'autres facteurs cellulaires émanant des microspores qui déterminent une ondulation de la membrane, le dépôt de primexine détermine la trame de formation du polymère de sporopollénine (Boavida et al., 2005). Une fois cette trame déterminée, les cellules du tapétum sécrètent les unités élémentaires du polymère de sporopollénine, le polymère majeur de l'exine. Celles-ci commencent à se déposer et polymériser sous forme de protrusion dans la partie distale de la paroi de callose. Suite à la dissolution de la callose par les enzymes sécrétées par le tapétum, la nexine apparaît à l'extérieur de la membrane plasmique (stade 8 figure I.10) et permet par la suite la formation des baculae qui vont s'appuyer dessus et croître de façon tangentielle pour former un réseau externe continu : le tectum (stade 9 figure I.10). La primexine va ensuite disparaître et laisser la place à une consolidation de l'exine. Puis, avant le stade microspore tricellulaire (stade 11 figure I.10), un dépôt de matériel fibreux en provenance du tapétum se fixera sur l'exine et servira d'assise au futur manteau (stade 10 figure I.10 ; Owen and Makaroff, 1995; Paxson-Sowders, 1997; Piffanelli et al., 1998). En parallèle, une strate supplémentaire d'exine, la nexine II, se forme entre la membrane plasmique et la nexine I. Suite à l'accroissement des grains de pollen en fin de développement de la paroi pollinique, le réseau de sporopollénine est étiré. Son épaisseur diminue et en conséquence le volume des lacunes augmente (Suzuki et al., 2008).

L'intine quant à elle est de nature pectocellulosique et va se former entre la membrane plasmique et la nexine II (stade 9-10 figure I.10). Sa synthèse est d'origine gamétophytique et commence après la libération des microspores.

Le manteau pollinique est également une structure issue des cellules du tapétum. Il est déposé dans les cavités de l'exine au cours d'un processus de synthèse active de composés

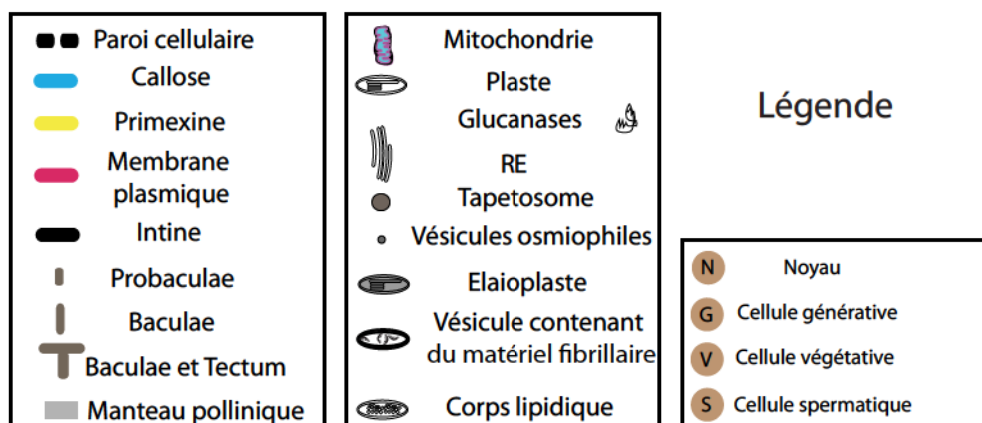


Légende figure I.10 Evènements de biosynthèse de la paroi pollinique au sein du développement floral chez *Arabidopsis thaliana*.

A. Représentation schématique des évènements de biosynthèse de la paroi pollinique au sein des cellules du tapetum au cours du développement de la fleur (échelle de Smyth) et du tapetum (échelle de Sanders). L'origine de l'échelle est en haut et le développement se déroule dans le sens des aiguilles d'une montre. Les différents stades sont indiqués et les principales modifications morphologiques du tapetum et de la fleur sont symbolisées.

B. Aggrandissement du modèle de formation de la paroi pollinique selon l'échelle de Sanders et d'après Scott et al. (1994).

A et B. La formation de la paroi débute avant la méiose par la transcription des gènes impliqués dans la mise en place du patron de l'exine au sein du noyau des cellules mères du pollen (stade 5). Suite à la méiose, une paroi de callose a été formée et a isolé les tétrades de microspores (stade 6). Les composés nécessaires à la mise en place de la trame de la paroi pollinique (ondulations de la membrane plasmique) sont transportés par des vésicules dérivées du réticulum endoplasmique. Puis les composés de la primexine synthétisés par les microspores se déposent et recouvrent le grain de pollen à l'exception des sites destinés à former les pores germinatifs (stade 7). Conversion de la primexine en une couche apte à contenir la polymérisation de la sporopollenine (7a). Formation des baculae qui ont un aspect lamellaire en l'absence du polymère de sporopollenine. (7b-c). Consolidation des baculeae par polymérisation de la sporopollenine (7d). Début de la disparition de la primexine qui laisse place à la formation de la nexine I (7e). La paroi de callose autour des tétrades ainsi que la paroi cellulaire du tapetum sont dégradées facilitant l'excrétion des composés par les cellules du tapetum et permettant leur polymérisation autour des grains de pollen et une consolidation de l'exine (stade 8). Les microspores entrent alors en mitose pollinique et la formation de l'exine se termine par la synthèse de la nexine II (f) et de l'intine (g) (stade 9). Cette division asymétrique donne naissance à une cellule végétative contenant une petite cellule générative. Au sein des cellules du tapetum des plastes accumulent des gouttellettes lipidiques et des vésicules denses aux électrons se forment (les tapetosomes). D'autres vésicules remplies d'un matériel fibreux semblent être excrétées par les cellules du tapetum (stade 10). Celui-ci va s'accumuler au sein de l'exine et permettre le dépôt du manteau pollinique. Entre la première et deuxième division mitotique, les cellules du tapetum continuent d'accumuler élaio-plastes et tapetosomes avant de terminer le programme de mort cellulaire programmée débuté dès la fin de méiose (stade 11). La totalité du contenu des cellules du tapetosomes se déverse dans le locule et se fixe dans le manteau pollinique. Les grain de pollen continuent d'accumuler des corps lipidiques de stockage et entrent en déshydratation (stade 12). Durant la déshydratation les vésicules lipidiques se retrouvent enchassées au sein du RE et le manteau acquière une structure plus compacte terminant ainsi la maturation du grain de pollen. Environ 20 % de ces réserves lipidiques seront utilisées par le grain de pollen suite à la perte de son tissu nourricier, le tapetum. Le reste des réserves lipidiques et de RE du grain de pollen serviront de réserve membranaire lors de la germination (Piffanelli et al. 1998).



lipidiques et d'oléosines (Mayfield and Preuss, 2000; Ross and Murphy, 1996) concentrés au sein de corps lipidiques, d'élaïoplastes et de tapétosomes en fin de stade microspore bicellulaire (stade 10-12 figure I.10). Puis la dégénérescence des cellules du tapétum permettra le dépôt de matériel supplémentaire qui s'agrègera au reste du manteau lors de la déshydratation des grains de pollen.

3.3. Identification des acteurs protéiques impliqués

Les approches génomiques sont devenues les nouvelles armes des biochimistes. Avec l'avènement des données publiques de micro-arrays ainsi que des banques de mutants, de nombreux acteurs intervenant dans la synthèse de la paroi pollinique d'*Arabidopsis thaliana* ou du riz ont pu être identifiés ces dernières années. Des gènes régulateurs et structuraux de la synthèse de la paroi, des gènes de synthèse et de dégradation de la callose et des gènes impliqués dans la détermination spatiale du patron de l'exine ont déjà été identifiés, mais seuls ceux impliqués dans la synthèse de l'exine et du manteau seront traités ici en détail. Il faut cependant noter que la fonction exacte de ces gènes reste, pour la plupart, inconnue.

3.3.1. Synthèse de la primexine

Cinq études ont permis de démontrer une corrélation positive entre le dépôt d'exine et celui de primexine. Cinq mutants identifiés par des défauts dans la formation de la paroi présentent tous des problèmes de formation de la primexine ce qui *in fine* entraîne une stérilité mâle. Le mutant *dex1* (*deficient in exine*) par exemple présente une primexine réduite et dont la synthèse est retardée (Paxson-Sowders et al., 2001). Les baculae ne se forment pas et des agrégats de sporopollénine se constituent mais jamais ne se déposent à la surface des microspores. Chez les mutants *rpg1* (*ruptured pollen grain 1*) et *hkm* (*hakly microspore*), la primexine n'est pas déposée de façon uniforme (Ariizumi and Toriyama, 2011). En conséquence, l'exine est déposée elle aussi de façon aléatoire sur la primexine mais également sur la membrane plasmique, le tout résultant en la formation de microspores immatures recouverts d'agrégats de sporopollénine. La primexine de ces mutants est donc altérée mais partiellement fonctionnelle en comparaison de celle de *dex1* qui ne l'est plus du tout. Le mutant *nefl* (*no exine formation 1*) produit une primexine grossière sur laquelle aucune baculae ne se forme. Des agrégats de sporopollénine se forment autour des grains de pollen sans s'y déposer, suggérant que la primexine de ce mutant présente une diminution des

propriétés de liaison à l'exine (Ariizumi et al., 2004). Au contraire, le dépôt de primexine et de baculae ne se fait pas au stade microspore précoce dans les anthères du mutant *tde1* (*transient defective exine 1*). Des agrégats de sporopollénine se déposent ainsi de façon aléatoire sur le pollen. Mais ces défauts sont transitoires car les précurseurs de sporopollénine se déposent finalement à la surface des microspores de façon normale pour former des grains de pollen matures et viables dont l'aspect est semblable à ceux d'une plante sauvage. Ces résultats montrent que la protéine TDE1 intervient dans les processus d'initiation de la formation de l'exine. Le gène *TDE1* est similaire au gène *DET2* (*DE-ETIOLATED2*), impliqué dans la synthèse de brassinostéroïdes. Une application de ces hormones complète le phénotype du mutant *tde1* suggérant que les deux gènes interviennent dans le contrôle du dépôt de sporopollénine ou de sa polymérisation. Le gène *HKM* est quant à lui similaire à *MS1* et la protéine a été localisée dans le noyau, suggérant une fonction de facteur de transcription.

Pour l'instant, la fonction des protéines DEX1, NEF1 et RPG1 reste un mystère mais elles semblent toutes impliquées dans la détermination du patron de l'exine. De façon intéressante, une mutation à l'état hétérozygote de ces gènes n'a pas de conséquence sur la formation de la primexine des microspores. Ceci contredit des travaux antérieurs montrant que la formation de la primexine était sous le contrôle des microspores et indique que des déterminants sporophytiques sont également impliqués dans le contrôle de la formation de cette assise.

3.3.2. Ondulation de la membrane plasmique

D'un point de vue développemental, il serait rationnel de penser que la détermination de la trame de l'exine est liée à la mise en place d'ondulations dans la membrane plasmique sous l'action coordonnée du cytosquelette, du RE et de vésicules (figure I.10 stade post-méiose). L'étude des mutants *dex1*, *nef1*, *hkm* et *rpg1* conforte également l'hypothèse. En effet, ces ondulations ne sont pas observées chez les mutants, mais ceci peut être une conséquence directe ou indirecte des mutations. Il est tout de même à noter que la protéine RPG1 est une protéine membranaire qui pourrait jouer un rôle dans la régulation du trafic membranaire et interagir avec d'autres protéines pour coordonner le réseau de primexine.

3.3.3. Synthèse de la paroi de callose

Cette paroi est constituée de polymères linéaires de β -1,3-glucanes et entoure les microspores et tétrades. Pendant le développement des microspores, elle se forme au stade de la méiose entre la membrane plasmique et la paroi primaire des microsporocytes. Son implication dans le développement pollinique reste encore floue mais l'absence de cette paroi ou sa dégradation lors de la méiose entraîne une absence de formation de paroi pollinique. Elle pourrait servir de source de glucose lors de sa dégradation par les β -1,3-glucanases. Elle pourrait également intervenir dans la mise place du tectum en comprimant les baculae en croissance et en les forçant à croître de façon perpendiculaire. Enfin elle permettrait de limiter l'influence des tissus sporophytiques sur le développement des microspores. Pour déterminer la fonction de la paroi de callose des mutants touchés dans sa synthèse ont été recherchés (Ariizumi and Toriyama, 2011).

La mutation du gène *CALS5* (callose synthétase 5), qui intervient dans la synthèse de callose de l'anthere, implique également l'absence de synthèse de paroi de callose autour des microsporocytes. La sporopollénine se dépose aléatoirement sous la forme d'agrégats (Dong et al., 2005). Des allèles pour lesquels les conséquences de la mutation du gène sont moins fortes ont été caractérisés et les observations ont suggéré une corrélation positive entre l'importance du dépôt de callose et la formation du profil normal de l'exine. La surexpression de β -1,3-glucanases a, quant à elle, entraîné une dégradation précoce de la paroi de callose pendant la méiose et une absence totale d'exine (Tsuchiya et al., 1995). A l'inverse, la mutation du gène *AtMYB103*, qui serait impliqué dans la régulation de β -1,3-glucanases, conduit à une persistance de cette paroi et à une exine anormalement profilée (Zhang et al., 2007). En conclusion, la paroi de callose semble jouer un rôle dans la formation de l'exine en capturant les unités de primexine pour promouvoir leur concentration locale et éviter leur dispersion dans le locule mais pourrait aussi constituer un support physique pour son dépôt.

3.3.4. Synthèse de l'exine

L'exine est un polymère dont la dégradation ménagée suivie de l'analyse des produits de dégradation n'a pas permis de déterminer la composition précise. De plus, la synthèse des monomères formant le polymère de sporopollénine est un processus extrêmement rapide, qui a lieu dans des bourgeons à un moment de développement précis et dans un tissu unique, le tapétum, dont il est difficile d'obtenir des quantités suffisantes pour des analyses métaboliques. De nombreux mutants présentant une stérilité mâle ou des défauts de l'exine

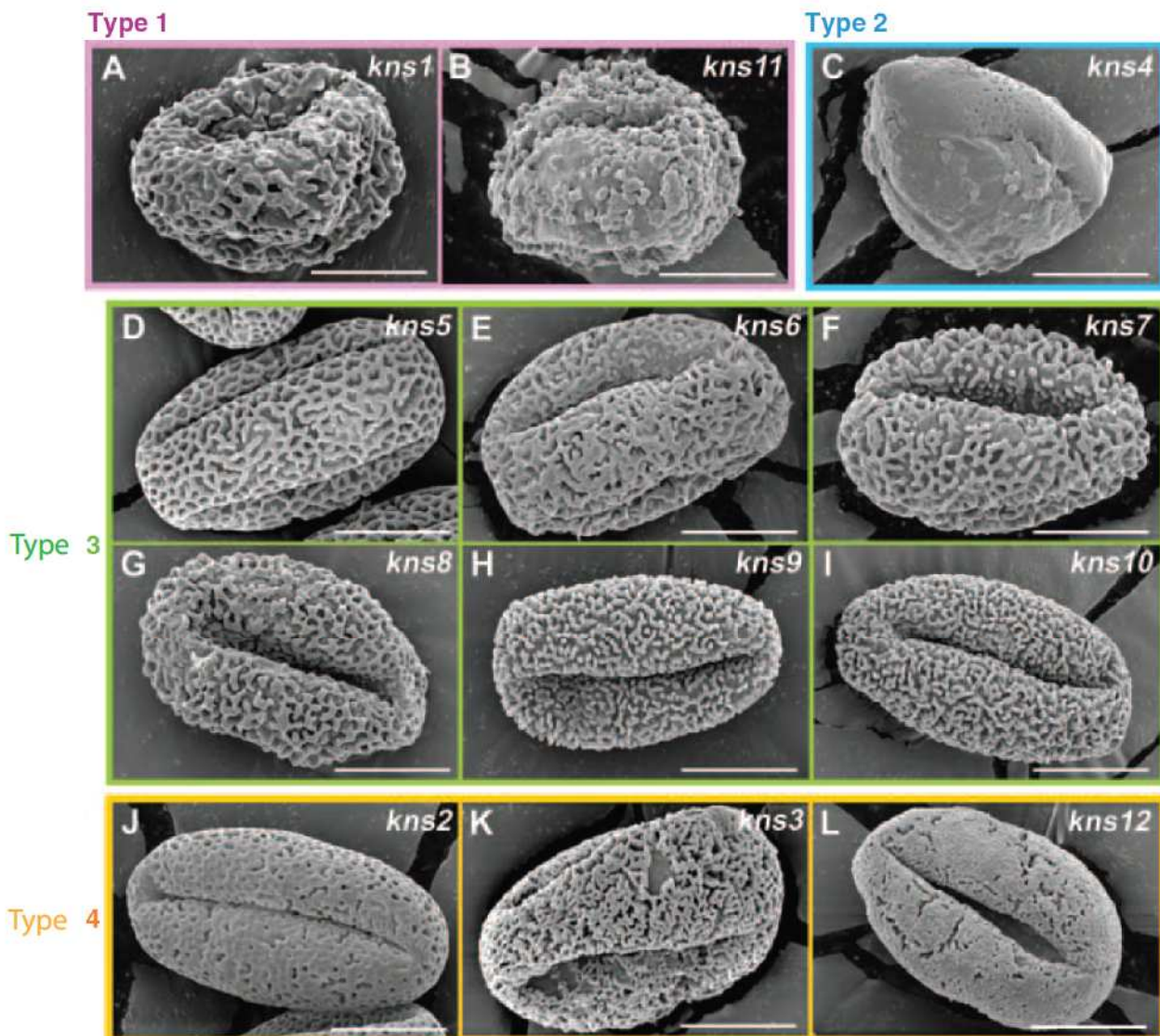


Figure I.11 Classification phénotypique des mutants kaonashi.

Lors de cette étude, de nombreux mutants ont été analysés. La caractérisation systématique par microscopie électronique à balayage de l'impact de la mutation sur la structure du grain de pollen a conduit à un classement en 4 types. Barre de 10 μm . D'après Suzuki et al., 2008.

ont été identifiés par plusieurs stratégies et, pour beaucoup, leur fonction a été déduite à partir d'homologie de séquence avec des protéines caractérisées dans d'autres contextes.

La première stratégie, dite de génétique classique, consiste à rechercher des plantes présentant des phénotypes de paroi de pollen défectueuse dans des collections de mutants. Deux exemples sont cités : Le 1^{er} a consisté à conduire un criblage massif d'une banque de mutants par microscopie à balayage afin d'identifier des gènes dont la mutation entraîne des défauts de formation de l'exine. A partir de 2000 plantes, Suzuki et al. (Suzuki et al., 2008), ont identifié 12 mutants pour le caractère anormal de leur exine. Ces mutants, appelés *kaonashi* (*kns*) (de la traduction japonaise de « faceless ») ont été regroupés en quatre catégories (figure I.11). La catégorie 1 regroupe des mutants dont le phénotype est semblable à celui du mutant *calS5*, suggérant qu'ils sont probablement impliqués dans la synthèse de la paroi de callose : *kns1* et *kns11* sont du type 1, et présentent une exine collapsée sans structure tectum-baculae caractéristique. Les mutants regroupés dans la catégorie n° 2 ont une exine très fine, conséquence probable d'une implication de ces gènes dans la formation de la primexine. *kns4* est du type 2 avec une réduction de la quantité d'exine. Les mutants *kns5*, *kns6*, *kns7*, *kns8*, *kns9* et *kns10* appartiennent à la troisième classe qui regroupe les mutants montrant une formation anormale du tectum. Les gènes touchés interviennent certainement dans l'initiation de la formation du tectum ou dans la biosynthèse et le dépôt des précurseurs de sporopollénine. Enfin les mutants *kns2*, *kns3* et *kns14* sont du type 4 et montrent une distribution anormale des baculae (figure I.11; Suzuki et al., 2008). Parmi ces mutants, seuls ceux du type 2 semblent correspondre à la perte de fonction de gènes impliqués dans des processus catalytiques de la formation de l'exine, mais pour l'instant aucune activité n'a pu être caractérisée.

D'autres équipes ont entrepris de cribler des mutants en mesurant le potentiel de leurs grains de pollen à se fixer sur le stigmate de la fleur. Cela a notamment conduit à l'identification des mutants *lap3-1* et *lap3-2* (*less adherent pollen 3*). L'analyse des grains de pollen en microscopie électronique a ensuite révélé une exine plus fine que celle du pollen sauvage, avec des anomalies dans son patron. La fonction du gène a ensuite été identifiée par clonage positionnel. Celui-ci code pour une protéine proche d'une strictosidine synthétase, mais l'analyse précise de sa séquence indiquerait une activité différente qui n'a pas encore été caractérisée (Dobritsa et al., 2009a). En effet, le domaine hydrophobe liant le substrat ainsi que le site actif, caractéristiques des enzymes de cette famille, sont différents dans le cas de LAP3. Des analyses métaboliques des anthères des mutants *lap3-1* et *lap3-2* ont révélé une forte diminution de l'abondance en nonacosane et naringenin suggérant un rôle lié au

Figure I.12 Caractérisation phénotypique de l'impact de la mutation *faceless pollen wall1 (flp1)* sur la structure du grain de pollen.

Observation au microscope électronique à balayage de grains de pollen sauvage (A) et mutant *flp1* (B). Observation par microscopie électronique à transmission de coupes de bourgeon sauvage (C) et mutant *flp1* (D). Barre de 10 µm. D'après Ariizumi et al., 2003.

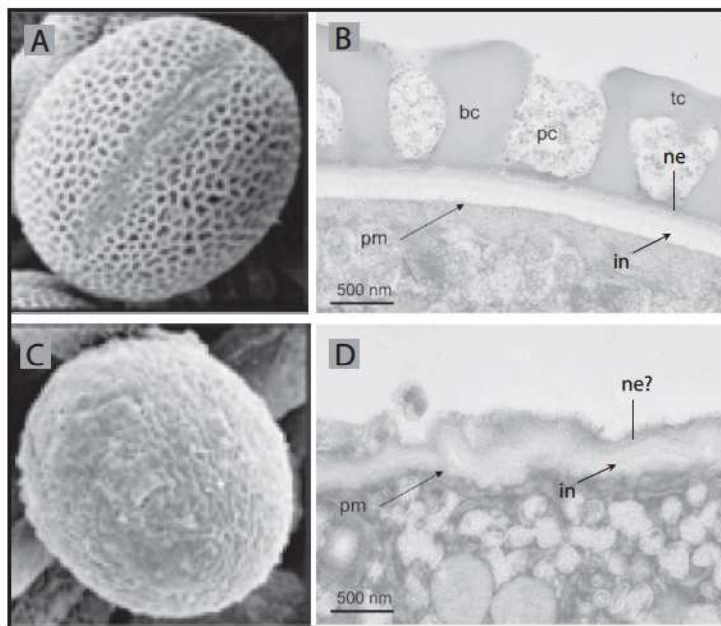
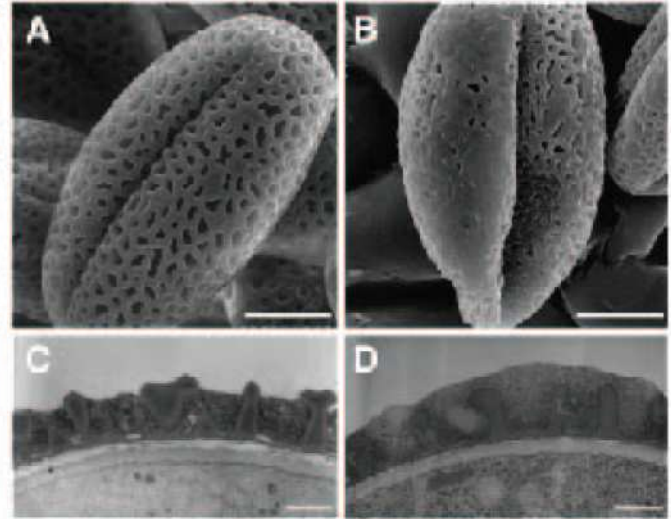


Figure I.13 Analyses de la structure des grains de pollen d'*Arabidopsis* sauvage et du mutant *cyp703A2*.

Observations au microscope électronique à balayage de grains de pollen sauvages (A) et du mutant *cyp703A2* (C). Observation au microscopie électronique à transmission de coupes de grains de pollen sauvage (B) et mutant *cyp703A2* (D). bc, baculae; in, intine; ne, nexine; pc, manteau pollinique; pm, membrane plasmique; tc, tectum. Barre 20 µm. D'après Morant et al., 2007.

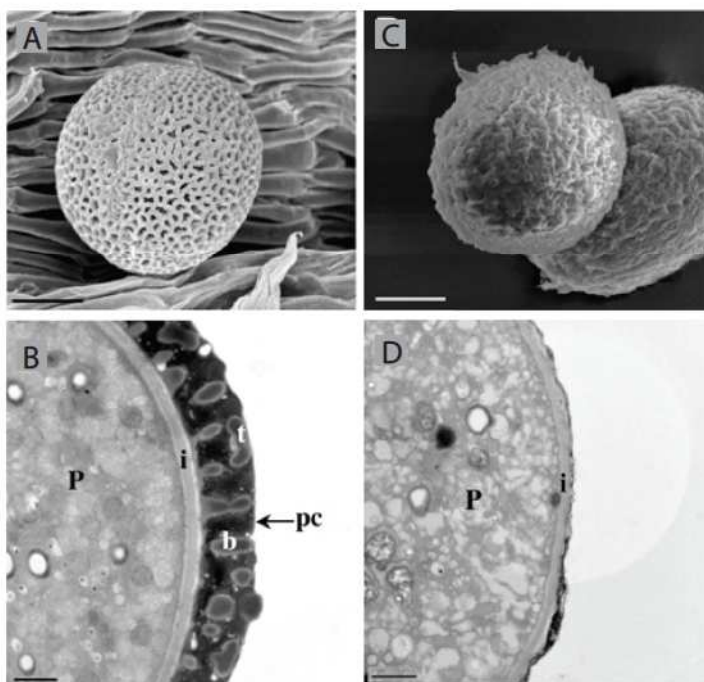


Figure I.14 Analyses de la structure des grains de pollen d'*Arabidopsis* sauvage et du mutant *cyp704B1*.

Observations au microscope électronique à balayage de grains de pollen sauvages (A) et du mutant *cyp704B1* (C). Observation au microscopie électronique à transmission de coupes de grains de pollen sauvage (B) et mutant *cyp704B1* (D). b, baculae; i, intine; pc, manteau pollinique; p, pollen; t, tectum. D'après Dobritsa et al., 2009.

métabolisme des cires et des flavonoïdes respectivement et non au métabolisme des alcaloïdes comme suggéré par les similarités de séquences avec la strictosidine synthétase.

Une autre stratégie plus aléatoire consiste à identifier certains gènes grâce à l'étude de leur expression par fusion de leur promoteur à la protéine GUS : Une expression précoce dans le tapétum ou dans les microspores indiquant une possible implication qui a pu parfois être confirmée par une étude phénotypique. Cela a été le cas pour la protéine DRL1 (Dihydroflavonol Reductase Like) d'*Arabidopsis* (Tang et al., 2009). Rapidement après la dissolution des tétrades, les microspores du mutant *drl1* entrent en dégénérescence confirmant ainsi l'implication de DRL1 dans la synthèse de l'exine.

Chez *Arabidopsis*, le mutant *flp1* (*faceless pollen-1*) et chez le riz, les mutants *wda1* (*wax-deficient anther1*), *cyp704b2* (Hui Li et al., 2010), montrent tous des défauts de formation à la fois de l'exine et de la cuticule de l'anthere. FLP1 est similaire à WAX2/YOREYORE/ECERIFERUM3 et pourrait donc être impliqué dans la production d'alcools secondaires et de cétones (Ariizumi et al., 2003). La fonction enzymatique n'a pas été démontrée mais la mutation du gène chez le riz empêche la formation de nombreux composés lipidiques et des corps d'Ubish (figure I.12), des vésicules formées au sein du tapétum potentiellement impliquées dans le transport des précurseurs de l'exine. Chez les mutants *flp1* et *wda1*, l'abondance des cires est modifiée (Jung et al., 2006; Li et al., 2006). Une similarité de séquence est observée entre les gènes *WDA1* et *FLP1*. Ces deux gènes pourraient être impliqués dans la même voie de biosynthèse des acides gras à longue chaîne. Par ailleurs l'expression dans la levure de l'enzyme CYP704B2 permet l'hydroxylation en ω des acides gras C16 et C18. Ces résultats constituent des arguments forts soutenant l'implication du métabolisme des acides gras dans la formation de ces deux biopolymères de sporopollénine et de cutine.

Sur la base de l'observation de réduction de dépôt d'exine, d'autres mutants ont pu être identifiés, les mutants *cyp703A2* (Morant et al., 2007) et *cyp704B1* (Dobritsa et al., 2009b) notamment. Tous deux présentent une réduction de fertilité et une dégénérescence d'une grande partie de grains de pollen. Ceux restants dans le locule présentent une exine quasi-inexistante (figure I.13 et 14). Les deux protéines font partie de la famille des CYP450 et leur activité *in vitro* a été caractérisée. CYP703A2 hydroxyle des acides gras de longueur moyenne en milieu de chaîne et CYP704B1 en position ω les acides gras C16 et C18 majoritairement. Les deux protéines ont été localisées dans les cellules du tapétum et semblent être ancrées sur le réticulum endoplasmique, mais pour l'instant l'activité enzymatique n'a pu être confirmée par des études *in planta*. Ces résultats soulèvent à nouveau

l'importance du métabolisme des acides gras tout comme la découverte du mutant *ms2*. La perte de fonction de MS2 entraîne une dégénération rapide des microspores après leur individualisation dans le locule. MS2 est exprimée lors du stade tétrade dans les plastes des cellules du tapétum et présente une similarité de séquence avec une enzyme capable de réduire des acides gras en alcools chez le jujubier (Aarts et al., 1997). Très récemment, il a été démontré que, *in vitro*, MS2 est capable de réduire les esters d'acyl-ACP en C16 en alcools primaires. De plus, une variation de composition des composés de cutine et de cires cuticulaire a pu être constatée lors de la surexpression de la protéine dans des feuilles de *Nicotiana tabacum* transgéniques (Chen et al., 2011). Ce travail révèle ainsi indirectement, pour la première fois *in planta*, que la synthèse d'alcools gras primaires est une étape clef de la synthèse de la paroi pollinique chez *Arabidopsis*.

L'implication du métabolisme lipidique dans la synthèse de sporopollénine a été confirmée par l'étude récente du mutant *acos5*. Les premiers phénotypes apparaissent dès la dissolution des tétrades de microspores. La paroi pollinique ne se forme pas, les microspores dégèrent rapidement et la plante est en conséquence stérile. Ce phénotype est en accord avec un rôle précoce d'ACOS5 dans la formation de la paroi pollinique et à la différence des mutants *cyp703*, ou *ms2* par exemple, ses anthères ne contiennent aucun grain de pollen viable. Une des explications possibles de ce phénotype est que la protéine a un rôle plus en amont dans la biosynthèse des précurseurs de sporopollénine. L'étude de la fonction de la protéine confirme cette hypothèse. La protéine ACOS5, exprimée dans les cellules du tapétum lors du développement de la paroi, montre *in vitro* une activité d'estérification d'un large panel d'acides gras et particulièrement de l'acide oléique (C18 :1) et d'acides gras hydroxylés pour former les acyl-CoA correspondants (de Azevedo Souza et al., 2009). Dans la mesure où les protéines CYP703A2, MS2 et ACOS5 sont fortement co-régulées dans le tapétum, que la perte de leur fonction entraîne des phénotypes similaires et qu'elles utilisent toutes des acides gras comme substrats, celles-ci pourraient participer à une même voie métabolique impliquée dans la formation de précurseurs de sporopollénine.

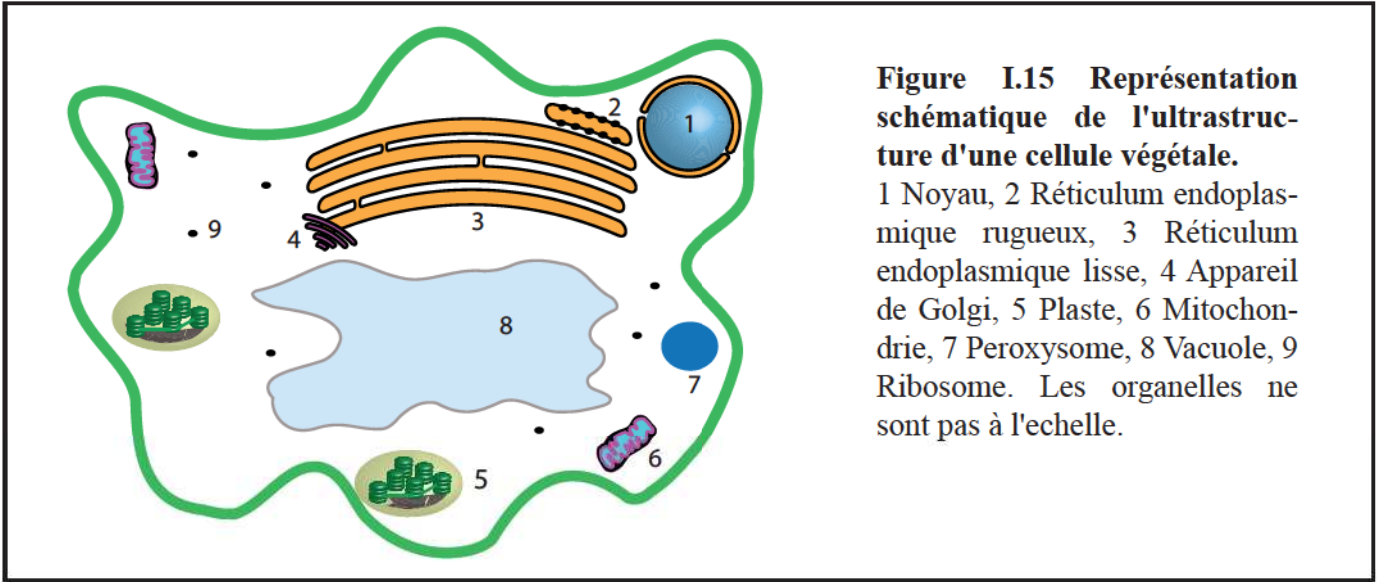


Figure I.15 Représentation schématique de l'ultrastructure d'une cellule végétale. 1 Noyau, 2 Réticulum endoplasmique rugueux, 3 Réticulum endoplasmique lisse, 4 Appareil de Golgi, 5 Plaste, 6 Mitochondrie, 7 Peroxisome, 8 Vacuole, 9 Ribosome. Les organelles ne sont pas à l'échelle.

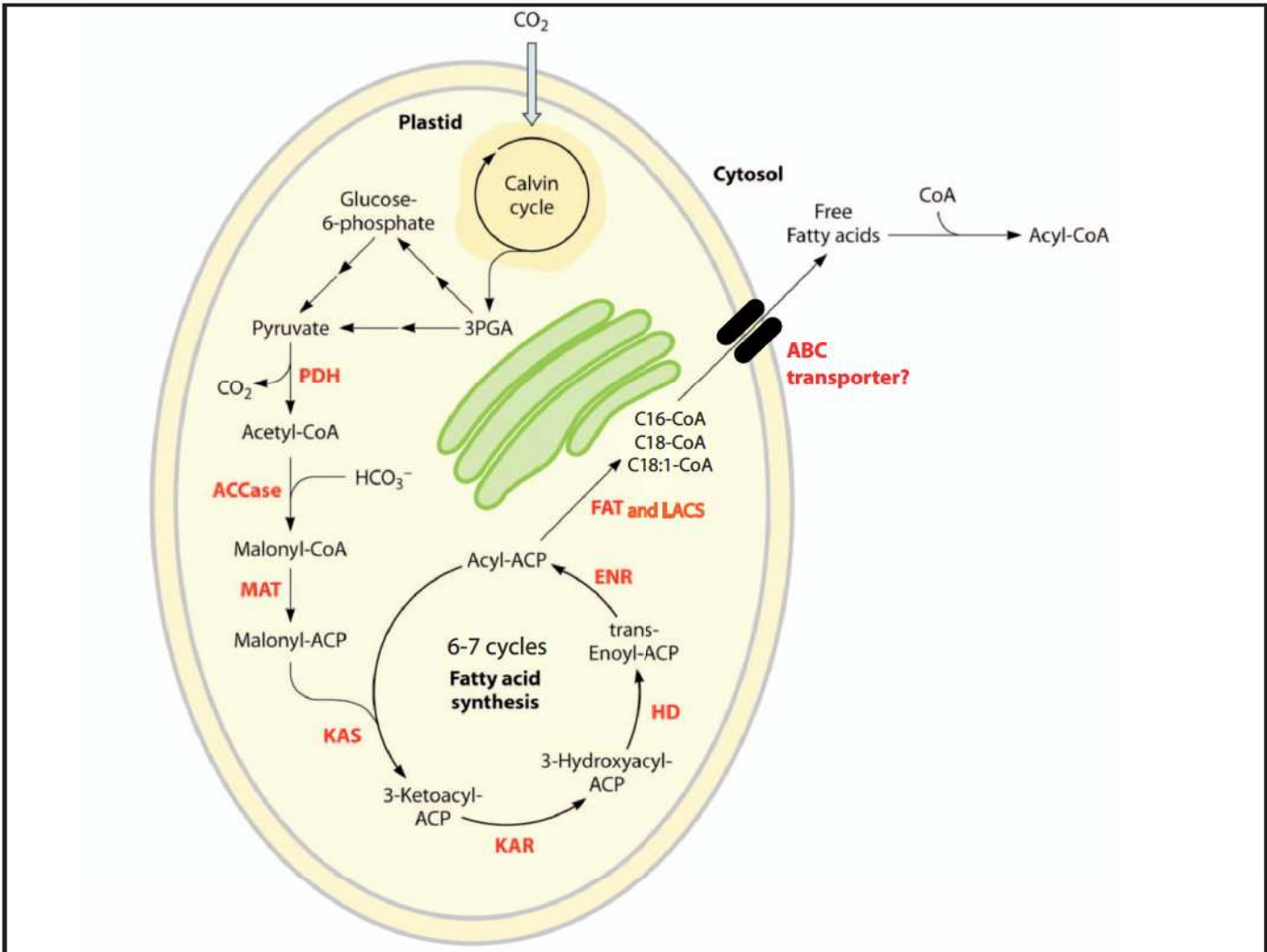


Figure I.16 Représentation simplifiée de la voie de biosynthèse des acides gras chez les végétaux. La synthèse des acides gras se déroule dans les plastes, à partir de pyruvate ou d'acétyl-coA, catalysée par les enzymes notées en rouge. Après 6-7 cycles de condensation, les C16-ACP/C18-ACP formés sont clivés par des thioesterases (FAT) puis complexés au CoA par l'action d'acyl-CoA synthases (LACS). Leur exportation est probablement catalysée par un transporteur ABC. ACCase, acetyl-CoA carboxylase; ACP, acyl carrier protein; CoA, coenzyme A; ENR, enoyl-ACP reductase; FAT, fatty acyl-ACP thioesterase; HD, 3-hydroxyacyl-ACP déshydratase; KAR, 3-ketoacyl-ACP reductase; KAS, 3-ketoacyl-ACP synthase; LACS, long chain acyl-CoA synthetases; MAT, malonyl-CoA:ACP transacylase; PDH, pyruvate dehydrogenase complex. Modifié d'après Radakovits et al., 2010

II. Métabolismes associés au développement de la paroi du pollen

Nous avons étudié la formation de la paroi pollinique en particulier les changements anatomiques qui apparaissent au cours du développement du pollen. Pour préciser ces connaissances, nous allons maintenant voir comment les acteurs protéiques identifiés s'organisent au sein de la cellule et comment des voies métaboliques s'y mettent en place pour former les précurseurs de sporopollénine, les exporter et permettre leur incorporation dans le polymère.

L'analyse chimique du polymère révèle la présence de chaînes carbonées dérivées d'acides gras et de phénylpropanoïdes pontés par des liaisons esters et éthers (Morant et al., 2007). Dans le but de caractériser de nouveaux acteurs protéiques intervenant dans la synthèse de la sporopollénine, il est nécessaire de s'intéresser à ces voies de biosynthèse.

1. Les voies métaboliques associées à la synthèse de l'exine

1.1. Métabolisme des acides gras et précurseurs de la paroi pollinique

1.1.1. La biosynthèse des acides gras chez les plantes

Dans les cellules eucaryotes (figure I.15), les acides gras sont le plus souvent formés dans le cytoplasme, mais chez les plantes leur synthèse débute dans les plastes. Ensuite, une partie des acides gras est envoyée vers le RE pour y subir des modifications supplémentaires. Dans les cellules du tapétum, les proplastes se divisent lors des stades précoces de développement et forment des élaïoplastes qui seront impliqués dans la synthèse des lipides de l'exine ainsi que du manteau.

Chez les végétaux, la condensation initiale est catalysée par une acétyl-CoA carboxylase (ACCase, figure I.16), complexe multienzymatique qui permet la formation de malonyl-CoA à partir d'acétyl-CoA et de carbonate (Radakovits et al., 2010). Les plantes possèdent généralement deux isoformes de cette enzyme, un hétérodimère localisé dans les plastes et responsable de la synthèse des acides gras et une forme homodimérique cytosolique impliquée dans la synthèse d'acides gras à très longue chaîne ou de flavonoïdes. Cette enzyme constitue l'étape limitante de la voie de biosynthèse. Intervient ensuite une malonyl-CoA:ACP transacétylase qui permet de former le malonyl-ACP. A partir de ce métabolite, les

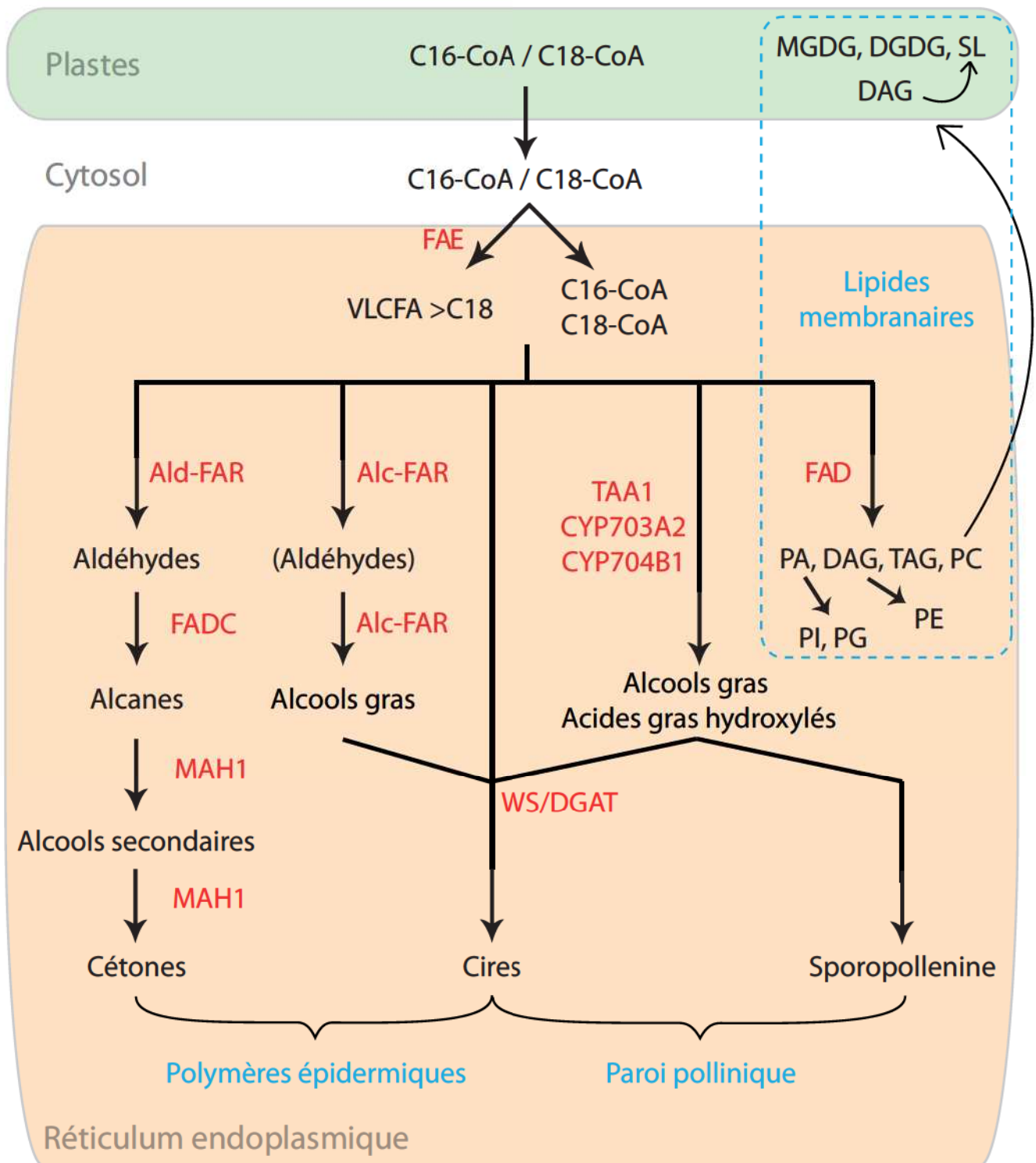


Figure I.17 Métabolisme des acides gras dans le règne végétal.

Les acyl-coA formés au sein des plastes sont en majorité modifiés au sein du réticulum endoplasmique par différentes enzymes (en rouge) pour former les composants des polymères épidermiques, de la paroi pollinique ou des membranes.

Alc, Alcool; Ald, Aldéhyde; CYP, cytochrome p450; FAD, désaturase d'acides gras; FADC, décarboxylase d'acides aldéhyques; FAE, élongase d'acides gras; FAR, réductase d'ester de CoA d'acides gras; MAH1, hydroxylase d'alcane intrachaîne; TAA1, réductase d'acides gras; WS/DGAT, Synthétase de cires/diacylglycérol acyltransférase.

DAG, Di-acylglycérol; DGDG, digalactosyl diacylglycerol; MGDG, Monogalactosyl diacylglycerol; PA, acide phosphatidique; PC, phosphatidylcholine; PE, phosphatidyl ethanolamine; PG, phosphatidylglycerol; PI, phosphatidyl inositol; SL, Sulfoglycoglycérolipides; TAG, tri-acylglycérol; VLCFA, acide gras à très longue chaîne.

acides gras seront formés par condensation cyclique. Ces condensations sont réalisées par l'acide gras synthétase (FAS) dont il existe deux types. Le premier type est présent chez les animaux et la levure (FAS I) alors que le second dit de type procaryotique est présent chez les plastes végétaux et les procaryotes. Cette dernière acide gras synthétase est un complexe enzymatique des 4 protéines 3-ketoacyl-ACP synthétase (KAS), 3-ketoacyl-ACP réductase (KAR), 3-hydroxyacyl-ACP déshydratase (HD), enoyl-ACP réductase (ENR). Plusieurs complexes FASII coexistent au sein du chloroplaste et diffèrent par la présence de trois types de KAS spécifiques d'une longueur de substrat donnée. KAS III formera un 3-Ketoacyl-ACP à partir du malonyl-ACP et d'acetyl-CoA. L'intervention des enzymes KAR, HD et ENR permettra de former un acyl-ACP. Ce dernier produit entrera alors dans une phase d'élongation cyclique de 2 carbones catalysée par les deux autres isoformes de KAS I (C4 à C16) puis KAS II (C16 et C18). Les C16-ACP et C18-ACP formés sont alors libérés de l'ACP par des acyl-ACP thioestérases (FAT) et estérifiés au CoA. Les acyl-CoA sont alors exportés vers le cytoplasme (Shi et al., 2011).

1.1.2. Les précurseurs lipidiques de la sporopollénine

Dans certaines cellules la demande en acides gras est très importante et s'ajoute aux acides gras nécessaires à la formation ou réparation des membranes. Les acides gras sont utilisés pour le stockage d'énergie dans les graines oléagineuses par exemple ou la synthèse de produits du métabolisme secondaire comme ceux entrant dans la composition de polymères de protection. Lors de ces processus, les acides gras subissent des modifications particulières : formation de triacylglycérols pour les lipides de stockage et élongation, désaturation, oxydation, estérification ou polymérisation pour les lipides de polymères (cutines par exemple). Pour cela, les acides gras couplés au Coenzyme A au sein du cytosol sont exportés vers le réticulum endoplasmique (figure I.17). Ce transport entre les plastes et le réticulum reste pour une grande part inconnu mais on a pu remarquer qu'à certains endroits, le réticulum était attaché au plaste par l'intermédiaire de protéines appelées PLAMs (plastid-ER-associated membranes). Ces points de contact pourraient être les routes majeures du transport d'acides gras.

Au niveau du RE se forment par exemple les acides gras à très longues chaînes (VLCFAs, C20-34), composants des cires de la subérine et de la cuticule. Cette synthèse nécessite la condensation cyclique d'unités malonyl-CoA et d'esters de CoA d'acides gras par différents complexes enzymatiques. Ceux-ci contiennent une élongase (KCS pour β -

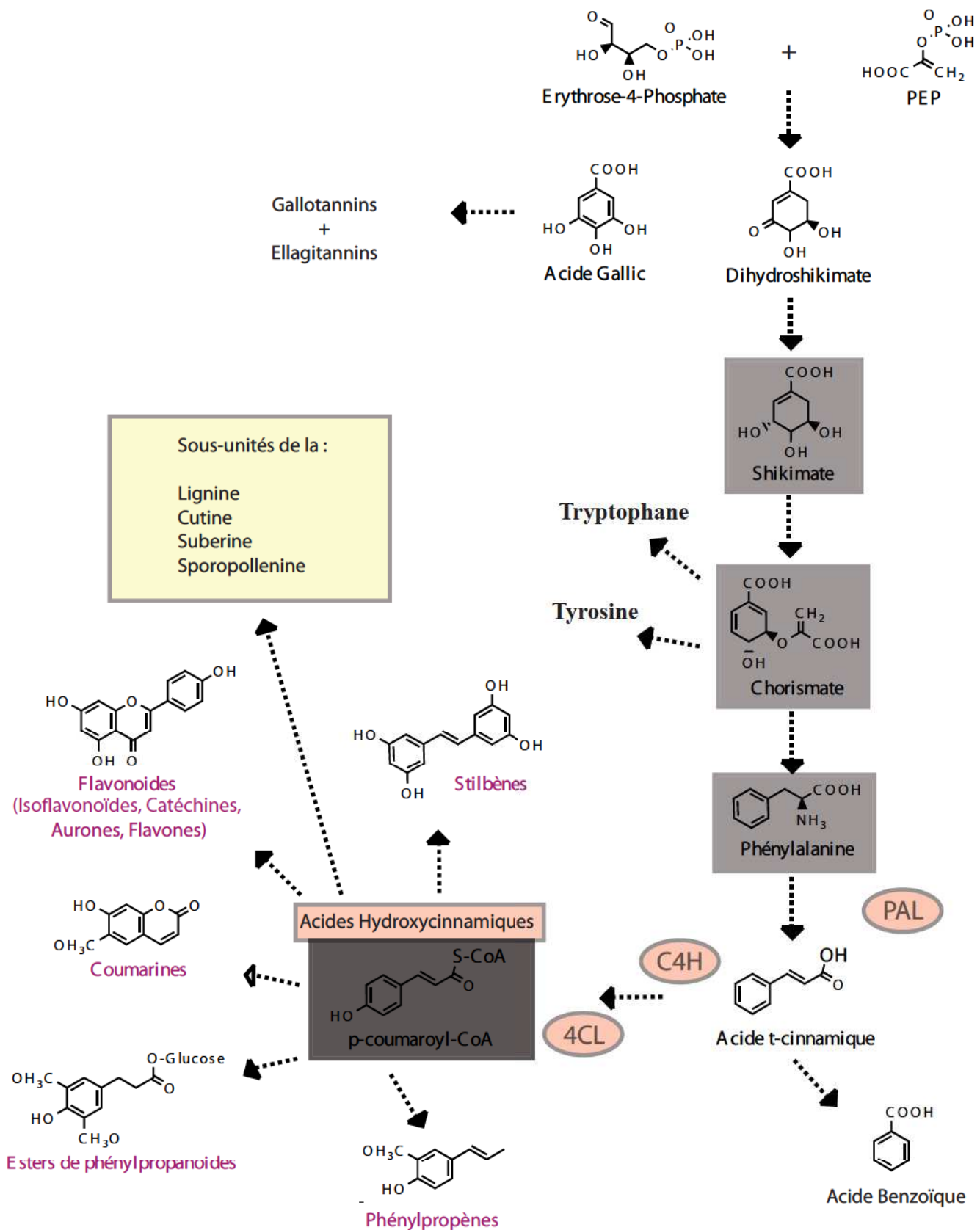


Figure I.18 Voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques et voie des phénylpropanoïdes

Les métabolites principaux de la voie du shikimate sont surlignés en gris clair. Les acides hydroxycinnamiques, métabolites carrefour des phénylpropanoïdes sont surlignés en gris foncé (avec pour exemple le p-coumaroyl-coA). Les enzymes PAL (Phénylalanine Ammoniac Lyase), C4H (Cinnamate 4-Hydroxylase) et 4CL (4-Coumarate-CoA Ligase) intervenant dans leur synthèse sont surlignées en rose. Les principales familles de composés phénoliques secondaires (en violet) dérivant du métabolisme secondaire sont représentées par des exemples non exhaustifs.

ketoacyl-CoA synthétase) qui permet la formation d'un acide gras de longueur définie, deux réductases (KCR et ECR) et une déshydratase (PHS1p). Ces VLCFAs sont alors modifiés au niveau du réticulum en alcools, esters, aldéhydes, alcanes, cétones et estérifiés avant d'être exportés à la surface de la cellule (figure I.17).

Certains des acteurs protéiques impliqués dans la synthèse de la sporopollénine que nous avons décrit sont impliqués dans la modification d'acides gras et ont été reportés sur la figure I.17. Les CYP703A2 et 704B1, notamment, sont impliquées dans l'hydroxylation des acides gras précurseurs de la sporopollénine et pourraient avoir un rôle dans la biosynthèse d'autres polymères.

1.2. Métabolisme des phénylpropanoïdes et précurseurs de la paroi pollinique

1.2.1. La biosynthèse des acides aminés aromatiques

C'est la voie du shikimate qui assure la synthèse des acides aminés aromatiques (tryptophane, tyrosine et phénylalanine) chez les plantes et bactéries, alors que les animaux les tirent de leur alimentation (figure I.18). La voie biosynthétique se déroule dans les plastes des cellules végétales et débute par la condensation du phosphénolpyruvate (PEP) et de l'érythrose-4-phosphate (E4P) tous deux issus du métabolisme des carbohydrates (Vogt, 2010). Le cycle à 6 carbones formé servira ensuite de précurseur à la formation du shikimate puis du chorismate qui lui sera le précurseur des acides aminés aromatiques et donc d'une grande partie des composés à noyau benzoïque de la plante (Herrmann, 1995). Le tryptophane sera à l'origine de l'auxine, d'alcaloïdes comme la vinblastine et la morphine, de glucosinolates indoliques et de certaines phytoalexines (camalexine). La tyrosine servira par exemple de précurseur à certains alcaloïdes et enfin la phénylalanine constituera l'origine de la voie des phénylpropanoïdes. Ainsi, en plus de son rôle majeur dans le métabolisme primaire, la voie du shikimate constitue un lien essentiel avec le métabolisme secondaire.

1.2.2. Les précurseurs phénoliques de la sporopollénine

Le métabolisme des phénylpropanoïdes permet la formation de molécules qui représentent près de 40% du carbone organique de notre biosphère (Buchanan et al., 2001). Ce métabolisme secondaire est quasi exclusif des plantes terrestres et conduit à la synthèse de composés phénoliques simples ou complexes, dont la nature peut varier d'une espèce à l'autre

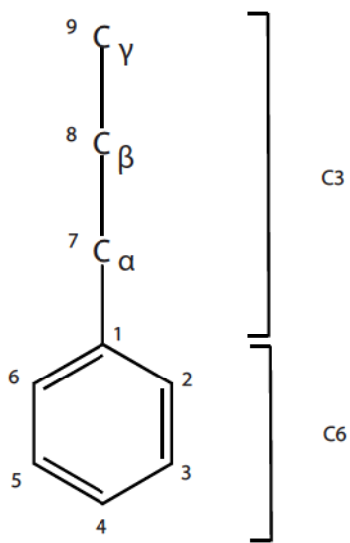


Figure I.19 Représentation schématique du squelette des phénylpropanoïdes.

La voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes produit des composés dotés d'un squelette carboné de base de type C6-C3 issu de la phénylalanine.

tout en gardant un squelette C6-C3 commun (noyau aromatique phényle et chaîne latérale à trois carbones propane) issu de la phénylalanine (figure I.19).

Sous l'action de la Phénylalanine Ammoniac Lyase (PAL), enzyme constituant le point de branchement entre le métabolisme primaire du shikimate et le métabolisme secondaire des phénylpropanoïdes, cet acide aminé est transformé en acide *t*-cinnamique (figure I.18). Puis, la voie des phénylpropanoïdes assure la synthèse des acides hydroxycinnamiques comme les acides *p*-coumarique, caféique, férulique et sinapique par des substitutions de type hydroxylation et méthylation du cycle aromatique. Leur synthèse est donc une succession d'étapes d'hydroxylation catalysées par des mono-oxygénases à cytochrome P450, d'O-méthylation des groupements hydroxyles catalysées par la Caféoyl-CoA O-Méthyltransférase (CCoAOMT) et la Caféate O-Méthyltransférase (COMT) et de réduction catalysées par la Cinnamoyl-CoA Réductase (CCR) et la Cinnamoyl Alcool Déshydrogénase (CAD).

Des voies de biosynthèse diverses et souvent spécifiques à une espèce conduisent à la formation des polyphénols, des flavonoïdes, isoflavonoïdes et stilbènes. Les acides hydroxycinnamiques peuvent être réduits en alcools (les monolignols) afin d'être dimérisés en lignanes ou bien polymérisés au niveau de la paroi cellulaire formant ainsi des polymères structuraux (lignine). Les acides hydroxycinnamiques peuvent également être estérifiés aux acides organiques pour former l'acide chlorogénique et sinapoylmalate par exemple, ou à des amines aliphatiques ou aromatiques (les phénolamides), mais surtout aux polysaccharides pariétaux par l'intermédiaire d'esters d'acide férulique pour y fixer des polymères protecteurs que je vais présenter un peu plus loin.

Cette diversité structurale se retrouve dans les fonctions biologiques de ces composés (figure I.20). Le métabolisme des phénylpropanoïdes est ainsi notamment impliqué dans la lignification, la pigmentation, les relations symbiotiques, la réponse aux stress biotiques ou abiotiques, la fertilité ou encore la signalisation (Baucher et al., 1998; Dixon and Paiva, 1995; Hahlbrock and Scheel, 1989; Shirley, 1996).

Diverses études ont suggéré la présence de phénylpropanoïdes dans la sporopollénine. Par exemple, Alves-Ferreira et al., (Alves-Ferreira et al., 2007) a montré que des enzymes de la synthèse des flavonoïdes sont exprimées dans les étamines lors du développement des grains de pollen. La répression de l'expression des enzymes PAL et CHS dans les cellules du tapétum lors du développement de la paroi pollinique entraîne des défauts de développement (Van der Meer et al., 1992) et des analyses chimiques du polymère de sporopollénine ont suggéré la présence de dérivés de phénylpropanoïdes (Dobritsa et al., 2011). Les produits de

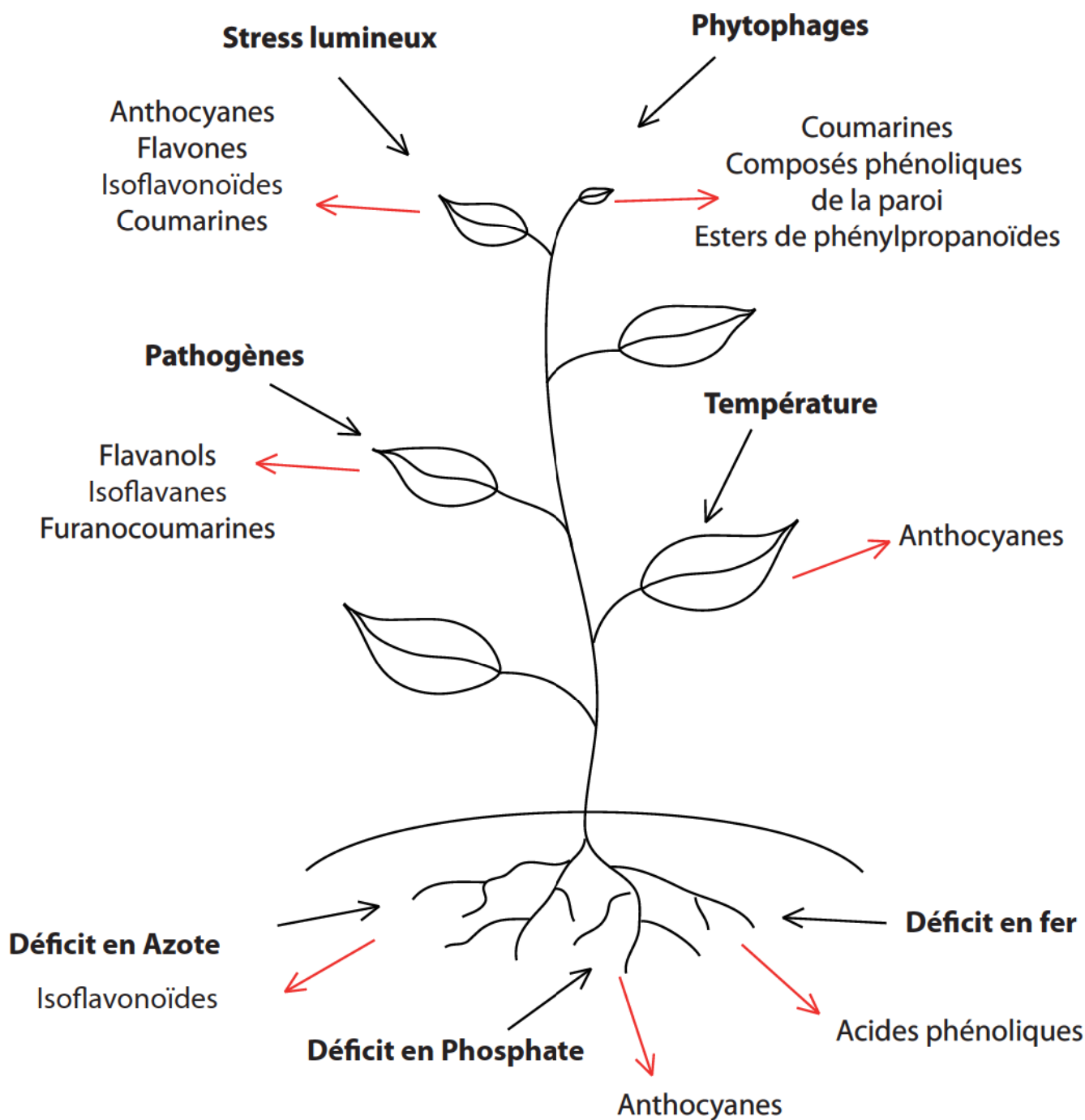


Figure I.20 Exemples de composés phénylpropanoïdes produits en réponse à différents stress

Les phénylpropanoïdes forment une classe de composés organiques avec une grande variété de fonctions, incluant la défense contre les herbivores, les attaques microbiennes et les autres agresseurs potentiels. Ils sont impliqués dans la lutte contre les déficits nutritionnels et sont des composants des parois cellulaires. Comme pigments, ils servent de protection contre les ultraviolets, et ce sont des molécules signales dans certaines interactions plante-microorganisme.

ce métabolisme pourraient lier la sporopollénine à la primexine ou faire partie intégrante du polymère.

2. La compartimentation des voies métaboliques

Comme nous venons de le voir, chez les végétaux, différents métabolismes permettent la formation d'une très grande variété de composés. Certaines voies enzymatiques sont ubiquitaires chez les végétaux supérieurs tandis que d'autres sont plus spécifiques de familles voire d'espèces végétales de plantes particulières. Ces métabolismes étant impliqués dans de nombreux processus physiologiques de la plante, non seulement dans le développement mais aussi dans l'adaptation de la plante à son milieu, l'organisation et la régulation de ces métabolismes sont vitales pour la plante. La régulation peut intervenir principalement au niveau transcriptionnel d'une part et par la mise en place de métabolons enzymatiques conduisant à la compartimentation de ces voies biosynthétiques d'autre part.

2.1. La compartimentation membranaire

Parmi les métabolites secondaires, certains ont une fonction importante et sont synthétisés dans de nombreux tissus de la plante. D'autres ont une fonction plus spécialisée et sont toxiques. Ils sont alors fabriqués et stockés souvent sous la forme de glycosides dans des sites ou compartiments spécifiques tels les tissus sécréteurs, vésicules ou vacuoles.

La synthèse des glucosinolates en est un exemple. Ce sont des composés toxiques contenant du soufre et de l'azote. Ils sont présents principalement dans l'ordre des Capparales (comme le chou, le colza ou la moutarde) et interviennent dans la défense des crucifères face aux herbivores ou aux agents pathogènes (Clay et al., 2009). La synthèse se déroule dans des cellules spécialisées riches en soufre présentes dans tous les organes et localisées entre le phloème et l'endoderme. Accumulés sous forme de glucoside inactif dans ces cellules, ils sont activés par le contact avec les myrosinases (ou thioglucosidases), enzymes de dégradation synthétisées par des cellules distinctes mais proches, lorsque les compartiments cellulaires sont brisés par un herbivore ou lors d'une blessure (figure I.20). L'hydrolyse entraîne la formation d'aglycones instables, qui, en se réarrangeant forment différents composés actifs toxiques (isothiocyanates, nitriles).

On comprend bien que la compartimentation cellulaire et subcellulaire confèrent certains avantages car les membranes constituent des barrières qui permettent à chaque

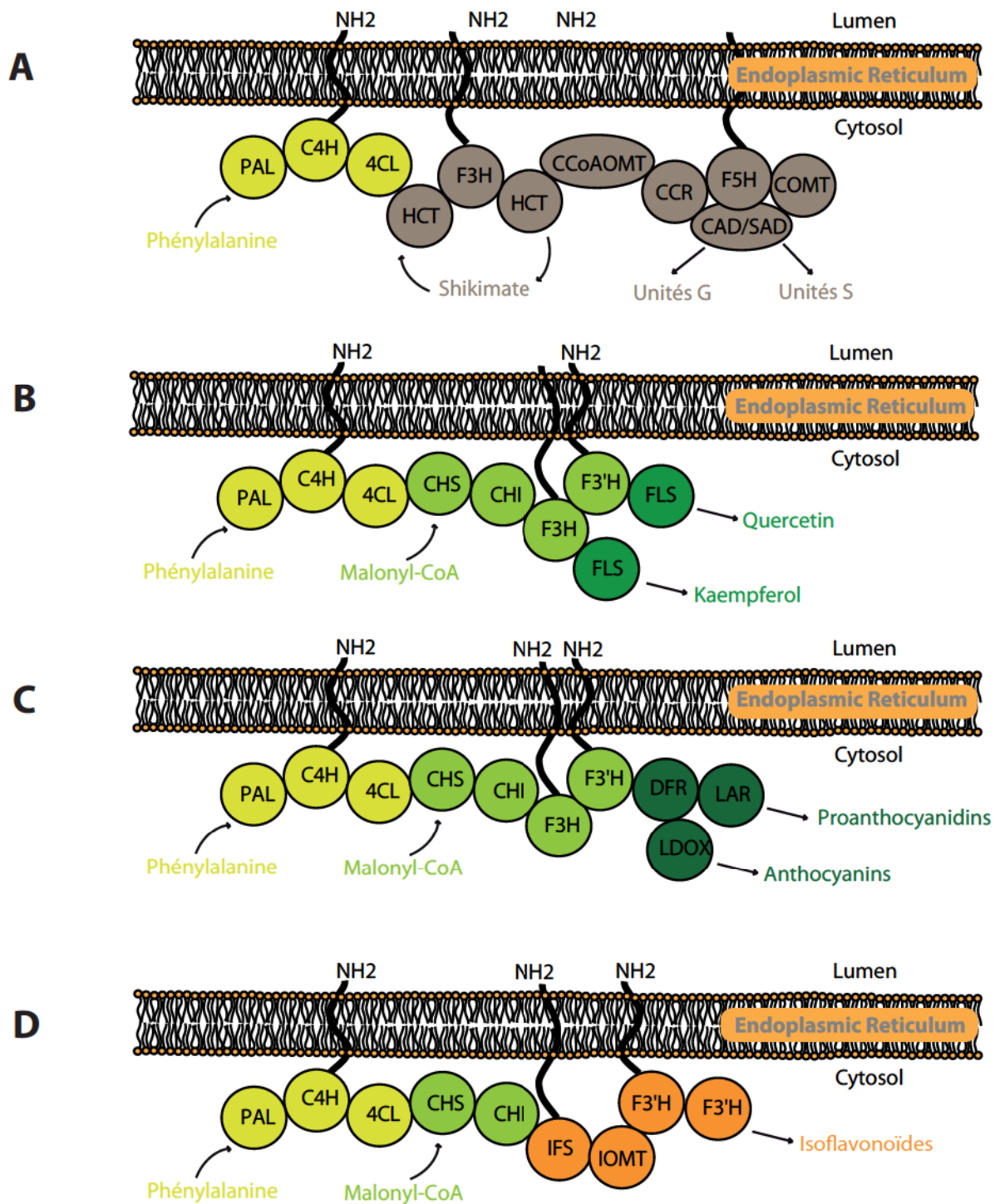


Figure I.21 Organisation des différentes branches du métabolisme des phénylpropanoïdes en métabolons.

Les enzymes communes à différentes voies métaboliques sont sur fond de même couleur. Différentes isoformes peuvent être mises en jeu dans les différentes voies, notamment pour les 4CL et PAL. Les enzymes en fin de voies métaboliques sont spécifiques à chaque voie de biosynthèse. Les métabolons sont ancrés à la membrane du RE par des cytochrome P450.

A. Biosynthèse des monolignols B. Biosynthèse des flavonoïdes. C. Biosynthèse des anthocyanes. D. Biosynthèse des isoflavonoïdes. PAL, phénylalanine ammoniac lyase; C4H, cinnamate 4-hydroxylase; C3H, p-coumarate 3-hydroxylase; HCT, hydroxycinnamoyl-CoA shikimate/quinatate hydroxycinnamoyl transférase; CCoAOMT, caféoyl-CoA O-méthyltransférase; COMTI, caféate O-méthyltransférase de classe I; F5H, férulate 5-hydroxylase; 4CL, p-coumarate CoA ligase; CCR, cinnamoyl-CoA réductase; CAD, cinnamoyl alcool déshydrogénase; SAD, sinapyl alcool déshydrogénase; CHS, chalcone synthase; CHI, chalcone isomérase; IFS, isoflavone synthase; F3H, flavanone 3-hydroxylase; F3'H, flavonoïde 3'-hydroxylase; DFR, dihydroxyflavonol 4-réductase; FLS, flavonol synthase; LDOX, leucoanthocyanidine dioxygénase; LCR, leucoanthocyanidine 4-réductase; IOMT, 2-hydroxyisoflavanone O-méthyltransférase; I2'H, isoflavone 2'-hydroxylase; IFR, isoflavone réductase. D'après Jorgensen et al., 2005

organite de conserver un environnement ionique et enzymatique particulier. De chaque côté de la membrane se trouve alors un milieu particulier favorisant un type de réaction biochimique donné. Dans les lysosomes par exemple on trouve des enzymes de digestions et un pH acide. Dans les plastes, la synthèse des acides gras implique la condensation d'acyl-CoA alors que dans les peroxysomes, ceux-ci sont oxydés par d'autres systèmes enzymatiques pour fournir de l'énergie. De façon générale, la compartimentation permet de co-localiser les enzymes et leur substrat et donc le fonctionnement simultané mais spatialement indépendant des voies cataboliques et anaboliques ainsi que le stockage des produits toxiques.

2.2. Les métabolons

Si la compartimentation subcellulaire permet la création d'un environnement ionique adapté à la fonction, la constitution de complexes multienzymatiques formés par l'association d'enzymes successives d'une même voie métabolique est encore plus intéressante. Les complexes enzymatiques permettent d'accéder à des rendements de production très élevés en efficacité et vitesse. En effet, le substrat initial de la voie de biosynthèse est pris en charge par la première enzyme. Ensuite le produit formé est directement utilisé par l'enzyme suivante sans être relargué dans le milieu. Le flux métabolique est ainsi guidé (« channeling »), les temps de latence réduits au minimum et les concentrations en substrat ou enzymes optimisées. De plus, les intermédiaires labiles ou toxiques pour la cellule sont de fait séquestrés (Jorgensen et al., 2005; Winkel, 2004).

L'existence de tels complexes a déjà été démontrée, par exemple pour la voie des phénylpropanoïdes (figure I.21). Ces métabolons sont typiquement composés d'enzymes solubles et membranaires et sont ancrées à la surface d'une membrane (Jorgensen et al., 2005). Ainsi, il a été observé que l'enzyme C4H (un CYP450) permet de fixer les enzymes PAL et 4CL au réticulum endoplasmique où la phénylalanine sera donc directement transformée en *p*-coumaroyl-CoA, point d'entrée du métabolisme des phénylpropanoïdes (Rasmussen and Dixon, 1999). Seule la C4H est une protéine strictement membranaire grâce à une ancre hydrophobe, mais *in planta*, les trois enzymes ont été co-localisées au niveau du réticulum endoplasmique (Czichi and Kindl, 1977; Davin and Lewis, 1991; Nakashima et al., 1997; Ro et al., 2001). Cette localisation spécifique a, par exemple, été démontrée par l'expression des protéines PAL et C4H en fusion avec la GFP (Achnine et al., 2004). L'existence d'interactions protéine/protéine entre ces enzymes a ensuite été montrée par une

expérience de fractionnement subcellulaire à partir de feuilles de tabac. Celle-ci visait à séparer les protéines solubles de celles fixées aux microsomes. Exprimée dans la levure, la PAL est soluble alors qu'elle était retrouvée dans la fraction microsomale lorsque la C4H était surexprimée (Achnine et al., 2004). Une expérience de microscopie par FRET (fluorescence resonance transfer) a ensuite confirmé cette interaction.

D'autres expériences ont ensuite montré que ces enzymes successives dans le métabolisme des phénylpropanoïdes sont parfaitement co-régulées dans leur expression. PAL, C4H et 4CL sont exprimées constitutivement dans le xylème et les fleurs, et sont induites simultanément en réponse à des stress biotiques et abiotiques.

In planta enfin, des expériences basées sur l'administration de précurseurs radiomarqués ont mis en évidence l'existence d'un flux métabolique ininterrompu entre la PAL et la C4H. L'incorporation *in planta* de phénylalanine radiomarquée et d'acide *t*-cinnamique froid dans des cellules végétales exprimant la PAL et la C4H abouti à la synthèse d'acide *p*-coumarique fortement radiomarqué. Cette expérience démontre que la C4H utilise préférentiellement l'acide *t*-cinnamique synthétisé par la PAL plutôt que l'acide *t*-cinnamique froid déjà présent dans le milieu (Czichi and Kindl, 1977; Hrazdina and Wagner, 1985).

La constitution de complexes enzymatiques a un dernier avantage. Certaines enzymes existent sous plusieurs isoformes, comme la 4CL d'*Arabidopsis* et celles-ci présentent des profils d'expression différents. A la vue des nombreux produits issus de cette voie de biosynthèse et de leur spécificité tissulaire de production, les différentes isoformes pourraient fonctionner dans des métabolons distincts dédiés à la synthèse de phénylpropanoïdes différents, comme la lignine ou les flavonoïdes (Ehlting et al., 1999). L'existence d'interactions préférentielles a d'ailleurs été démontrée entre les isoformes de PAL et de C4H du tabac (Achnine et al., 2004) et pour différentes enzymes de la voie des flavonoïdes et isoflavonoïdes (figure I.21; Burbulis and Winkel-Shirley, 1999; Saslowsky and Winkel-Shirley, 2001; Winkel, 2004). Les métabolons permettraient donc également de contrôler et de coordonner très rapidement le flux métabolique vers les différentes branches d'un métabolisme en fonction de contraintes environnementales changeantes.

3. Les polymères des parois cellulaires végétales

La paroi pollinique est donc constituée de trois éléments majeurs ; l'intine, l'exine et le manteau pollinique. Les précurseurs formant ces macromolécules sont issus de plusieurs voies métaboliques. Ensemble, ils protègent le pollen des fluctuations de l'environnement,

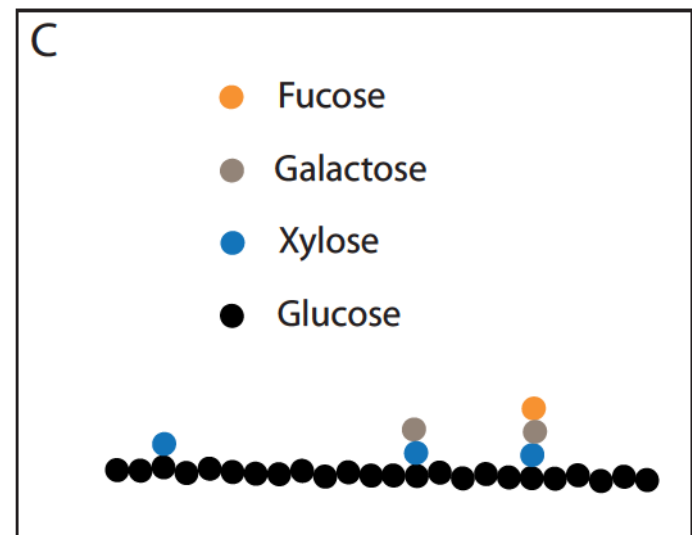
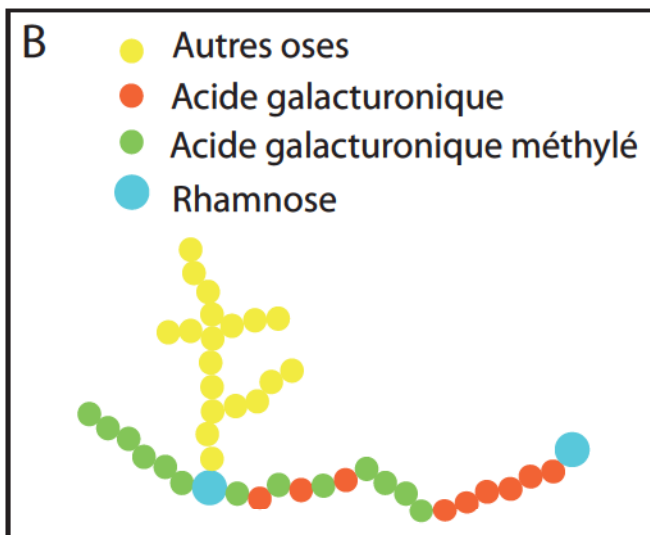
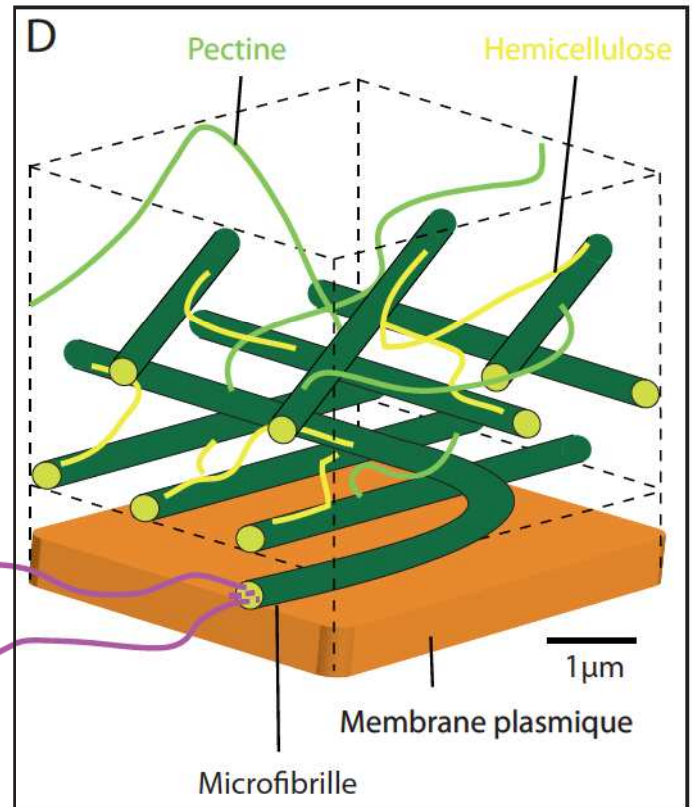
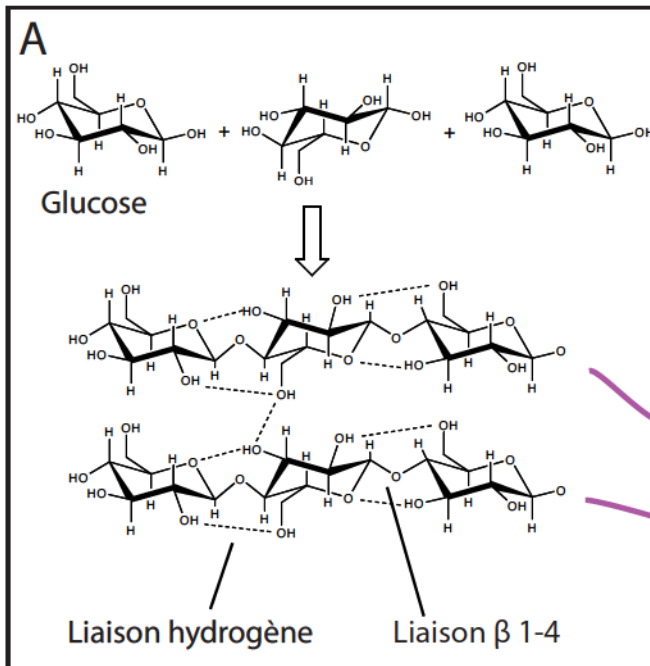


Figure I.22 Schémas représentant la paroi primaire végétale et les principaux polysaccharides pariétaux

- A. Représentation des liaisons covalentes et ioniques au sein du polymère de cellulose
- B. Représentation d'une chaîne de pectine
- C. Représentation d'une chaîne d'hémicellulose (ici du xyloglucane)
- D. Représentation schématique de l'organisation de la paroi primaire végétale

contrôlent les échanges avec celui-ci, contiennent la pression osmotique interne du grain de pollen tout en permettant sa croissance et sa germination. Séparément, les propriétés de chaque structure dépendent de leurs constituants et des interactions qu'ils établissent. Quel est le rôle de la sporopollénine dans la paroi ? Quels sont les monomères impliqués dans sa biosynthèse et comment sont-ils polymérisés pour former la sporopollénine ?

L'exine est un polyester de dérivés d'acides gras et phénylpropanoïdes. La lignine est un polymère végétal dont les précurseurs sont des unités monolignols dérivées de la voie des phénylpropanoïdes. Les précurseurs des polymères de la cuticule et de subérine sont des acides gras. La subérine contient également des phénylpropanoïdes. Ces polymères ont donc des origines biosynthétiques communes avec la sporopollénine et leur mode de formation peut aider à comprendre les mécanismes de biosynthèse de la sporopollénine. Pour identifier et placer de nouveaux acteurs dans la voie de biosynthèse de la sporopollénine, nous allons d'abord rappeler quelques éléments essentiels de la biosynthèse de la lignine, de la cuticule et de la subérine.

3.1. La lignine

3.1.1. Localisation et fonctions

Les cellules végétales sont entourées d'une paroi primaire mise en place pendant leur croissance. Cette structure insoluble est formée de polysaccharides (cellulose, pectines, hémicellulose et xyloglucanes), d'eau (liée aux constituants polysaccharidiques), d'ions (Ca^{2+} et H^+ importants régulateurs de la gélification des pectines et de la croissance cellulaire), d'enzymes variés (peroxydases, endo xyloglucane transférases, pectines méthyl estérases et pectinases) et de protéines de structure comme les chaînes d'Hydroxyprolin Rich Glyco Protein (HRGP) qui bloquent en fin de croissance les propriétés de plasticité du réseau polysaccharidique (figure I.22). Alors que la cellulose est élaborée au niveau de la membrane plasmique par des celluloses synthétases, les pectines et les hémicelluloses sont élaborées dans les vésicules golgiennes et sécrétées dans la paroi par exocytose.

La paroi pectocellulosique forme ainsi une barrière aux propriétés élastiques et d'une certaine résistance mécanique mais trop faible pour qu'une plante puisse conserver un port dressé ou être réellement protégée de l'environnement extérieur. Cette fonction de support est plus assurée par la lignine qui est un polymère se déposant dans la trame cellulosique en remplaçant une partie des substances matricielles pour la renforcer. De nature phénolique, les

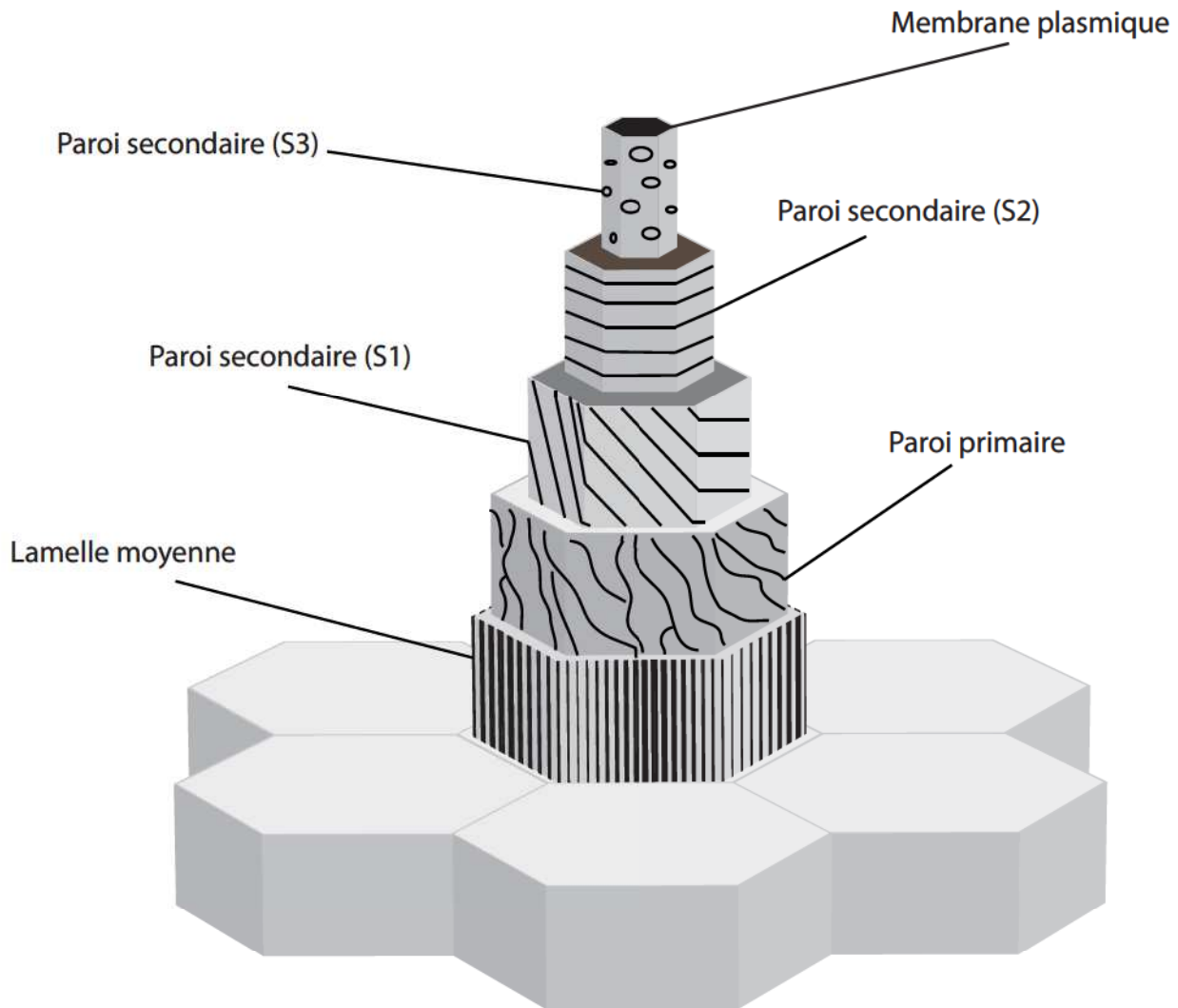


Figure I.23 La paroi pectocellulosique secondaire

La paroi primaire pectocellulosique est mise en place pendant la croissance des cellules végétales. L'interface entre les parois primaires des cellules voisines est appelée la lamelle moyenne. Essentiellement constituée de composés pectiques, elle permet de cimenter les cellules les unes aux autres et de former les tissus. Certaines cellules ayant terminé leur croissance et différenciation vont former une paroi secondaire sous la paroi primaire. Celle-ci est formée de 3 couches de microfibrilles en hélice (S1, S2 et S3) dont le sens de rotation change à chaque strate (Fengel et Wegener, 1984). L'épaisseur et la disposition des microfibrilles ainsi que l'ajout de lignine confèrent un degré de résistance bien plus élevé à ces cellules.

monomères de lignine confèrent au polymère une nature hydrophobe très résistante à la compression ou à la dégradation chimique (Fengel and Wegener, 1984). Le polymère est retrouvé dans les cellules spécialisées des tissus conducteurs, le xylème et le phloème. La lignine se dépose également dans la paroi secondaire de certaines cellules végétales (figure I.23), le sclérenchyme (pour solidifier ce tissu de soutien responsable du port dressé de la plante). Ce dépôt de lignine participe à la mort cellulaire programmée des cellules du xylème qui ne seront alors constituées que de la paroi (Fukada, 1996).

La lignification est ainsi un processus fondamental de l'évolution des plantes terrestres puisque c'est elle qui permet la croissance en hauteur des végétaux ligneux, favorisant la réception de l'énergie lumineuse. Elle offre également une barrière de protection contre l'attaque microbienne du végétal et permet la circulation de sève au sein des plantes vasculaires.

3.1.2. Nature des monomères

Après la cellulose, c'est le polymère le plus présent sur Terre. Il est quasi exclusivement composé d'unités dérivées du métabolisme des phénylpropanoïdes, les monolignols (unités H, G et S). Les monolignols sont formés à partir des esters de CoA d'acides *p*-coumarique, férulique et sinapique. Ceux-ci sont réduits lors de deux étapes successives par une cinnamoyl-coA réductase (CCR) et une cinnamoyl alcool déshydrogénase (CAD) en alcools hydroxycinnamiques (figure I.24). L'alcool *p*-coumarylique formera alors le précurseur des unités *p*-hydroxyphényles (H). Les précurseurs des unités guaiacyl (G) et syringyl (S) seront formés à partir des alcools coniférylique et sinapylique.

3.1.3. Stockage et transport des monolignols

Des expériences de génétique inverse et de marquage au ¹⁴C ont montré qu'ils sont transportés sous forme de glucoside (Lanot et al., 2006; Terashima et al., 1988) formés par des glucosyltransférases (Leinhos et al., 1994; Lim et al., 2005; Lim et al., 2001). Mais de récentes expériences semblent montrer que cette glycosylation n'est pas nécessaire (Bonawitz and Chapple, 2010). Leur transport vers la paroi pourrait être médié par des vésicules dérivant du Golgi ou par un transporteur ABC.

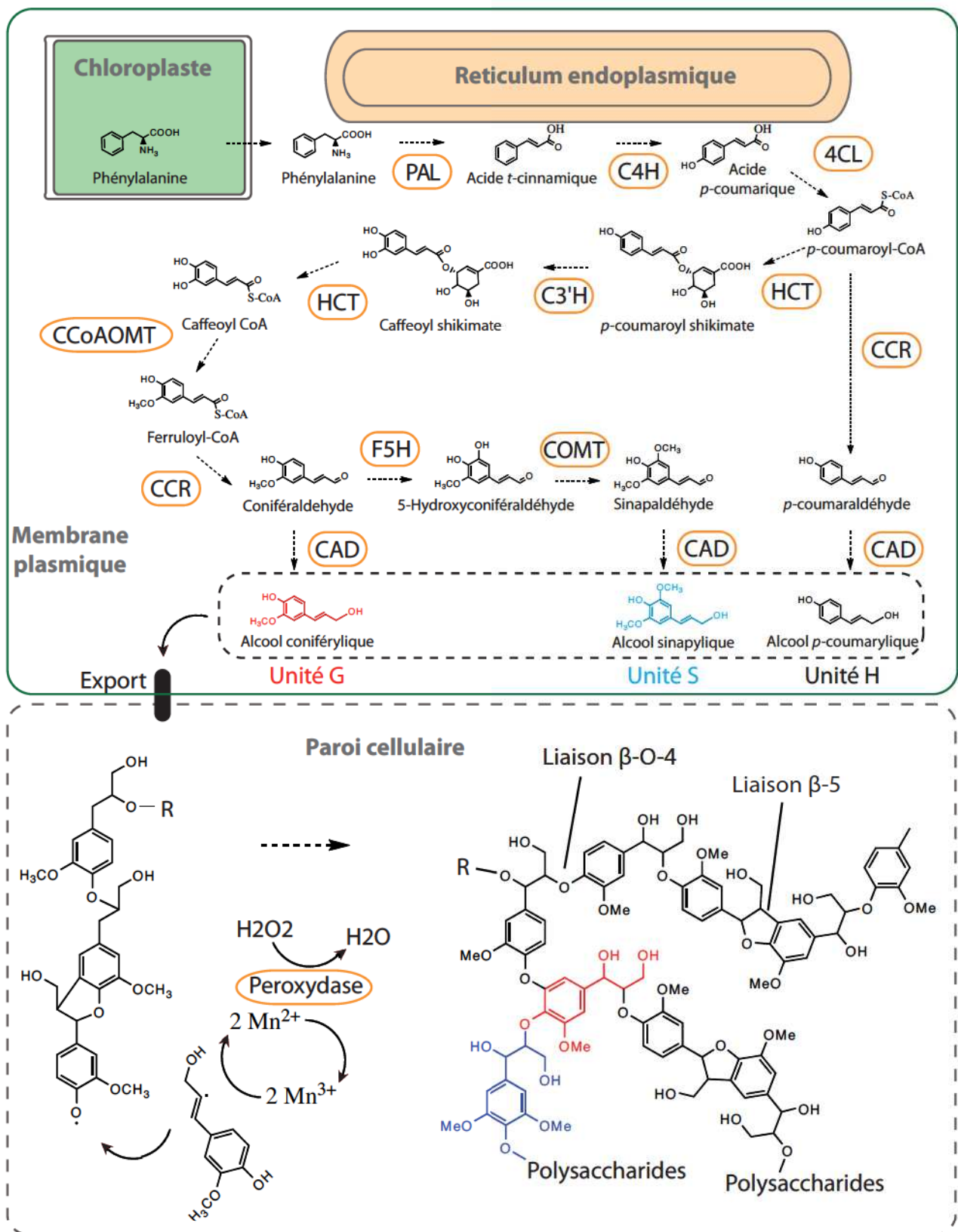


Figure I.24 Modèle de biosynthèse de la lignine et structure du polymère.

Les monolignols, précurseurs du polymère de lignine sont formés à partir de la phénylalanine par plusieurs enzymes (entourées d'un cadre orange) localisées à proximité du RE. Le transport des monolignols (unités H, G et S) du cytosol à l'apoplaste se déroule sous forme glycosylée et nécessite l'intervention d'un transporteur ABC.

Selon Önerud et al. (2002) la polymérisation nécessite la formation de radicaux formés par des peroxydases. Celles-ci catalyseraient l'oxydation d'atomes de Mn^{2+} , intermédiaires capables de pénétrer la structure compacte du polymère.

Le polymère de lignine serait lié aux polysaccharides parietaux par des liaisons éthers (avec le groupement hydroxyle en position 4 du cycle) ou esters (avec les hydroxyles des carbones α et γ des chaînes latérales).

3.1.4. Polymérisation des monolignols

Le dépôt de lignine est toujours précédé par le dépôt de polysaccharides (Terashima et al., 1988) qui sont les points de départ de la polymérisation et permettent une organisation préférentielle des noyaux aromatiques dans la matrice (Atalla and Agarwal, 1985). La polymérisation commence probablement par l'intervention de glucosidases (Baucher et al., 1998; Onnerud et al., 2002) qui libèrent les monomères, puis interviennent des enzymes extracellulaires de type polyphénol-oxydases (peroxydases et laccases) qui génèrent des radicaux libres par déshydrogénation (figure I.24; Baucher et al., 1998; Boerjan et al., 2003). Deux modèles d'assemblage sont ensuite possibles selon que la polymérisation est dirigée ou qu'elle se réalise de façon aléatoire comme le suggèrent les nombreux couplages observés chez le peuplier (Davin and Lewis, 2005).

3.1.5. Les liaisons chimiques au sein du polymère

Sur les unités H, G et S, la fonction phénolique en position C4 est la plus réactive, le radical se formera donc préférentiellement à cet emplacement et c'est sur le carbone β d'une chaîne en croissance que la formation d'une liaison sera la plus favorable. Les liaisons entre monomères les plus fréquentes sont donc de type éther β -O-4. Elles sont labiles et non condensées. Les autres sont de type carbone-carbone (β -5, β -1, β - β , 5-5), plus rigides et plus résistantes, on parle alors de liaisons condensées. Le polymère se présente sous la forme d'un réseau en 3 dimensions qui va également se lier aux polysaccharides, à l'acide férulique ou glycoprotéines via des liaisons ester avec les carbones α et γ ou éther avec l'hydroxyle en position 4 du cycle d'un monolignol en bout de chaîne (figure I.24; Monties, 1989). La proportion de chaque unité et les liaisons de condensations établies varient entre différentes espèces ou tissus et déterminent la rigidité et l'hydrophobicité du polymère (Bonawitz and Chapple, 2010).

3.2. La cuticule

3.2.1. Localisation et fonctions

Il y a 450 millions d'années, un groupe d'algues vertes a initié la colonisation du milieu terrestre grâce à l'apparition d'une nouvelle paroi les protégeant de la dessiccation tout

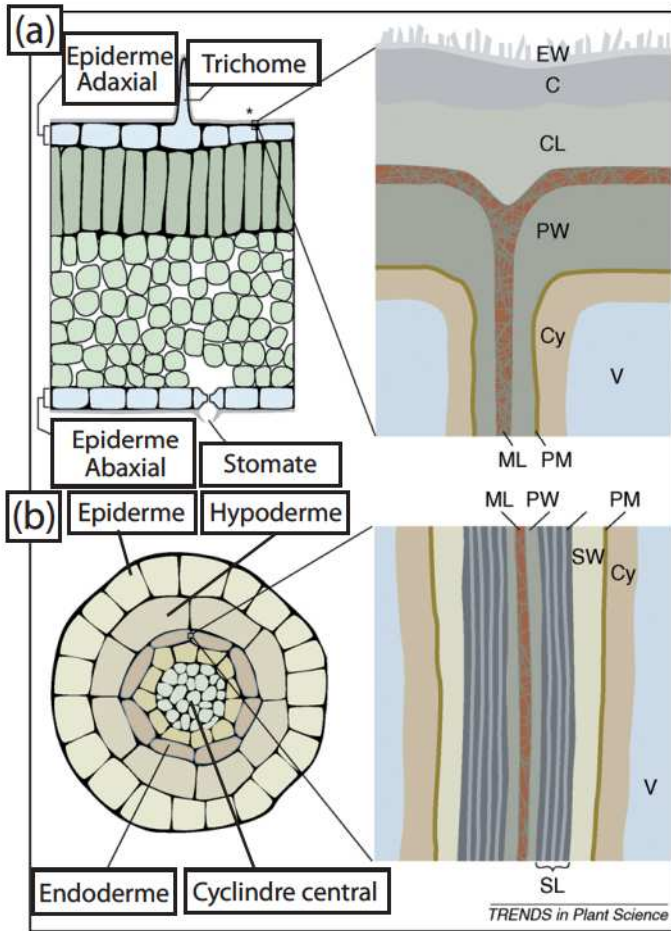


Figure I.25 Représentation schématique du dépôt de la cuticule et subérine (localisation et composition).

(a) Exemple de dépôt de la cuticule recouvrant la paroi externe des cellules de l'épiderme d'une feuille. L'épaisseur, la structure et la composition des différentes couches varie selon les espèces, les organes ou le stade de développement. Des cristaux de cires sont parfois présents à la surface. Les cires épicuticulaires (EW) recouvrent ainsi une pellicule de cutine enrobée de cires (C), strate composée de cutine, polysaccharides et cires intracuticulaires.

(b) Exemple de dépôt de subérine dans l'endoderme de racines (barrière de caspary). Le dépôt se situe entre la paroi secondaire (SW) et la paroi primaire (PW). Cy, cytoplasme; ML, lamelle moyenne; PM, membrane plasmique; SL, Subérine; V, vacuole.

(c) Structure et abondance des monomères principaux des polymères de cutine et subérine. Des structures représentatives de chaque groupe de monomère sont représentées. L'abondance reportée est issue de nombreuses études et correspond généralement à un pourcentage sur la masse totale de monomères identifiée après dépolymérisation et transestérification.

D'après Pollard et al., 2008.

(c) Monomer type	Abundance (%) and common monomers	
	Cutin	Subérine
Example		
Unsubstituted fatty acids 	1-25% C16:0, C18:0, C18:1, C18:2	1-10% C18:0 to C24:0
ω-Hydroxy fatty acids 	1-32% C16:0, C18:1, C18:2	11-43% C18:1, C16:0 to C26:0
α,ω-Dicarboxylic acids 	Usually <5% but >50% in Arabidopsis C16:0, C18:0, C18:1, C18:2	24-45% C18:1, C18:2, C16:0 to C26:0
Mid-chain functionalized monomers		
Epoxy-fatty acids 	0-34% C18:0 (9, 10-epoxy) C18:1 (9, 10-epoxy)	0-30% C18:1 (9, 10- epoxy-18- hydroxy) C18:0 (9, 10-epoxy-1, 18-diacid)
Polyhydroxy-fatty acids 	16-92% C16:0 (10, 16- dihydroxy) C18:0 (9,10, 18- trihydroxy)	0-2% C18:0 (9,10, 18-trihydroxy)
Polyhydroxy α,ω-dicarboxylic acids 	Traces	0-8% C18:0 (9,10- dihydroxy)
Fatty alcohols		
Alkan-1-ols and alken-1-ols 	0-8% C16:0, C18:1	1-6% C18:0 to C22:0
α,ω-Alkanediols and α,ω-alkenediols 	0-5% C18:1	0-3% C22:0
Glycerol 	1-14%	14-26%
Phenolics 	0-1% Ferulate	0-10% Ferulate, smaller amounts of coumarate, sinapate, caffeate

en permettant les échanges gazeux : la cuticule (Dominguez et al., 2011). En évoluant, ces organismes ont divergé de l'ancêtre originel et sont apparues des modifications du polymère conférant de nouvelles propriétés d'adaptation. Aujourd'hui, elle constitue une matrice extracellulaire incorporée à et recouvrant la paroi primaire des cellules de l'épiderme des parties aériennes des plantes ; fruits, feuilles et bourgeons (figure I.25). Elle est ainsi impliquée dans la protection de la plante face aux rayonnements UVs, aux organismes pathogènes, au stress mécanique et régule les échanges avec le milieu environnant la plante, notamment la perte d'eau.

3.2.2. Composition et nature des monomères

La cuticule est une barrière dont la composition évolue avec la distance à la membrane plasmique mais elle peut être représentée sous la forme de trois strates dont la proportion en chaque composant varie en fonction de l'espèce. En partant de la membrane plasmique, la première épaisseur est formée des polysaccharides de la paroi cellulaire et d'une matrice formée par le polymère de cutine. La seconde couche correspond au prolongement de la matrice de cutine dans laquelle sont incrustées des cires dites intracuticulaires. Enfin, cet ensemble est recouvert d'une pellicule de cires épicuticulaire, le tout formant une paroi de 0,1 à 10 micromètres d'épaisseur (figure I.25a; Bessire et al., 2011).

En isolant le polymère de cutine des cires et des polysaccharides, Franke et al (Franke et al., 2005) ont ainsi pu démontrer par l'établissement d'un profil métabolique GC-MS que la cutine est formée majoritairement d'acides carboxyliques C16 et C18 parfois insaturés et présentant de multiples fonctions hydroxyles et époxydes (figure I.25c). Cette analyse a également soulevé la présence d'une fraction non hydrolysable ; le polymère de cutane, formé d'acides gras polyinsaturés reliés par des liaisons éthers. Graca *et al.*, (Graca et al., 2002) ont démontré la présence de glycérol et lui ont attribué un rôle de liaison entre les différents acides gras du polymère. Enfin, la présence de composés phénoliques, acides hydroxycinnamiques et flavonoïdes, a également été révélée, mais leur liaison au polymère reste à définir (Hunt and Baker, 1980).

Les cires sont, elles, formées d'un mélange d'esters d'acides gras à très longue chaîne (C20-C40) comprenant des alcanes et alcènes hydroxylés (Bernard et al., 2012). Elles sont incorporés dans et à la surface du polymère de cutine et sont responsables de la résistance à la diffusion libre de composés au travers de cette paroi (Schreiber, 2010).

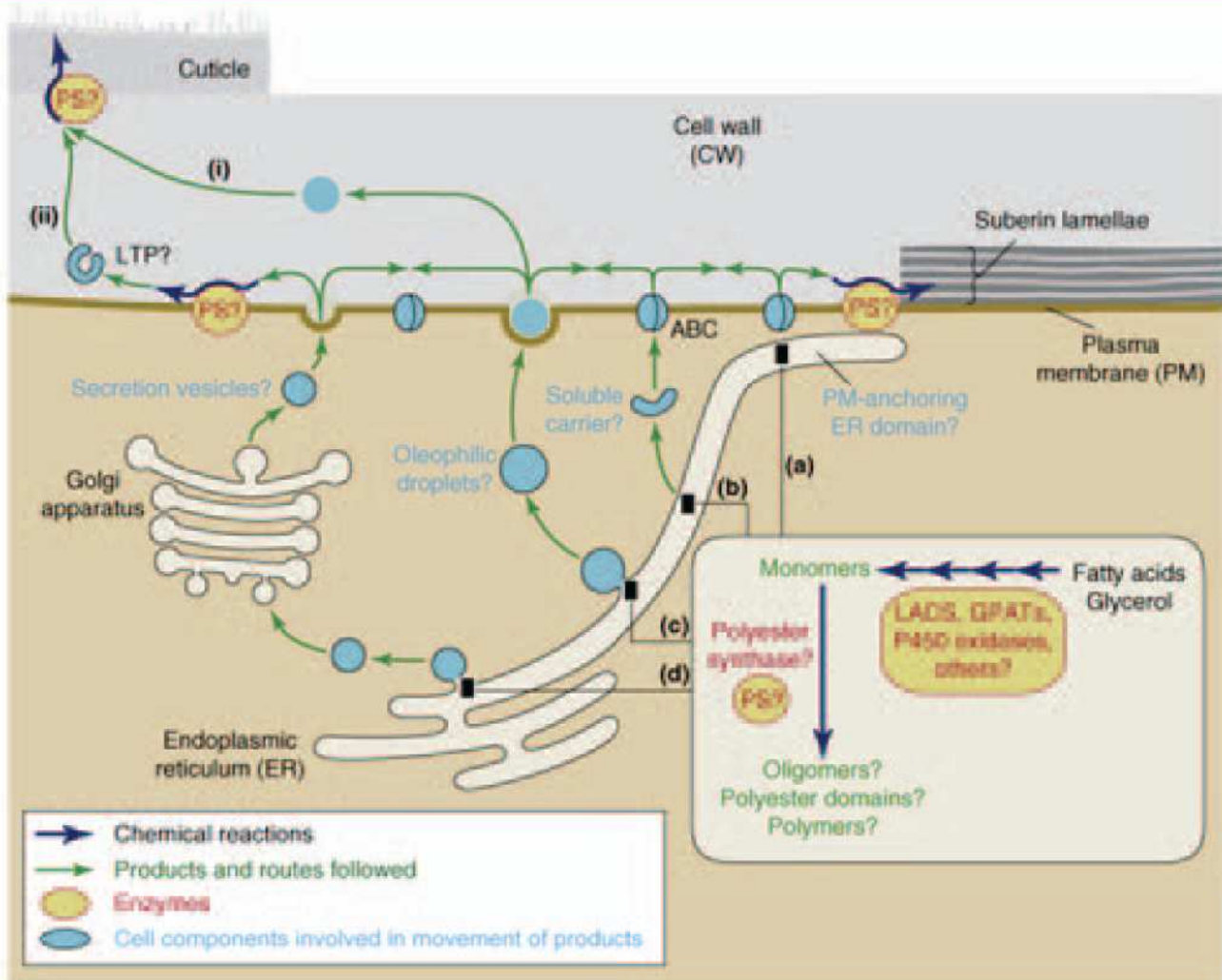


Figure I.26 Représentation schématique de la synthèse et du transport des monomères de cutine ou de subérine.

La synthèse des monomères de cutine ou subérine se déroule au niveau du réticulum endoplasmique (RE). Quatre mécanismes majeurs menant les monomères à la membrane plasmique sont les plus probables. Ils ne sont pas forcément exclusifs et d'autres sont possibles (a-d). (a) La synthèse des monomères dans le RE en contact avec la membrane plasmique est en couplage direct avec un transport via un transporteur ABC. Les monomères peuvent également être pris en charge par (b) des protéines cargo cytoplasmiques, des vésicules bourgeonnant du RE sécrétées sous la forme de (c) gouttelettes lipidiques ou (d) par l'appareil de Golgi. Une polymérisation partielle des monomères (entre eux ou avec des polysaccharides) au sein de la cellule peut être envisagée. Le transport de tels précurseurs emprunterait préférentiellement les voies (c) ou (d). Les précurseurs de la cuticule sont ensuite transportés de la membrane plasmique au site de polymérisation (I) par diffusion à travers l'apoplaste (II) ou au moyen d'un cargo protéique (lipid transfert protein) ou polysaccharidique. Les mécanismes de dépôt et de polymérisation ne sont pas représentés ici. Des enzymes semblent impliquées dans la formation des liaisons esters entre les monomères et oligomères, leur localisation est encore inconnue (PS, pour polyester synthétases). Des enzymes supplémentaires sont impliquées dans l'ancrage du polymère à la paroi cellulaire (CW).

D'après Pollard et al., (2008)

3.2.3. Stockage et transport des dérivés d'acide gras

Les acides gras précurseurs (C16 et C18) sont formés dans les plastes puis semblent être modifiés au sein de recoins du réticulum endoplasmique (figure I.26), par différents CYP450, Acyltransférases (GPATs) et Acyl-CoA synthétases (LACS) s'y concentrant, pour former les monomères transportés vers la membrane plasmique. Par analogie avec d'autres processus de transport intracellulaire de lipides, deux voies hypothétiques de transport de ces cires du RE à la membrane plasmique ont été proposées.

La première est un transfert direct par diffusion au niveau de zones de contact entre RE et membrane plasmique (figure I.26a; Staehelin, 1997). L'implication de protéines cytosolubles comme des LTP a été envisagée (figure I.26b; Levine, 2004). L'export des cires vers le domaine apoplastique serait ensuite médié par des transporteurs ABC. La mutation des transporteurs ABC ABCG32, CER5 et WBC11, par exemple, entraîne une diminution d'abondance de cires épicuticulaires (Bessire et al., 2011; Bird et al., 2007; Pighin et al., 2004), mais leur(s) substrat(s) n'a pu être identifié.

La seconde hypothèse repose sur un transport médié par le bourgeonnement de vésicules à partir du RE allant directement à la membrane plasmique (figure I.26c) ou empruntant la voie de sécrétion golgienne. Des vésicules denses aux électrons ont été identifiées dans les épidermes des plantes *Sorghum bicolor* et *Oryza sativa* (Hoffmann-Benning and Kende, 1994; MA et al., 1994), mais aucun des composés ou protéines connus de la cuticule n'y ont été retrouvés.

3.2.4. Polymérisation des dérivés d'acides gras

Une fois parvenus dans la paroi cellulaire, les monomères/oligomères vont soit diffuser librement soit interagir avec des LTP ou la paroi cellulaire pour rejoindre le lieu de polymérisation. Tout comme le transport, celle-ci reste une question ouverte. Les monomères ayant des fonctions réactives, à partir d'une certaine densité, la polymérisation pourrait se dérouler de façon autonome (Dominguez et al., 2011) dès la synthèse des monomères dans le RE. Mais l'identification des GPAT4 et 6 (glycérol phosphate acyltransférase) et de CD1 (cutin déficient 1) a démontré que la polymérisation des monomères de cutine est médiée par des enzymes (Yeats et al., 2012). Les 2-monoacylglycérol formés par les GPAT sont les substrats de l'acyltransférase CD1. *In vitro*, cette enzyme est capable de transférer l'acyle du 2-monoacylglycérol sur la fonction OH terminale d'une autre molécule de 2-

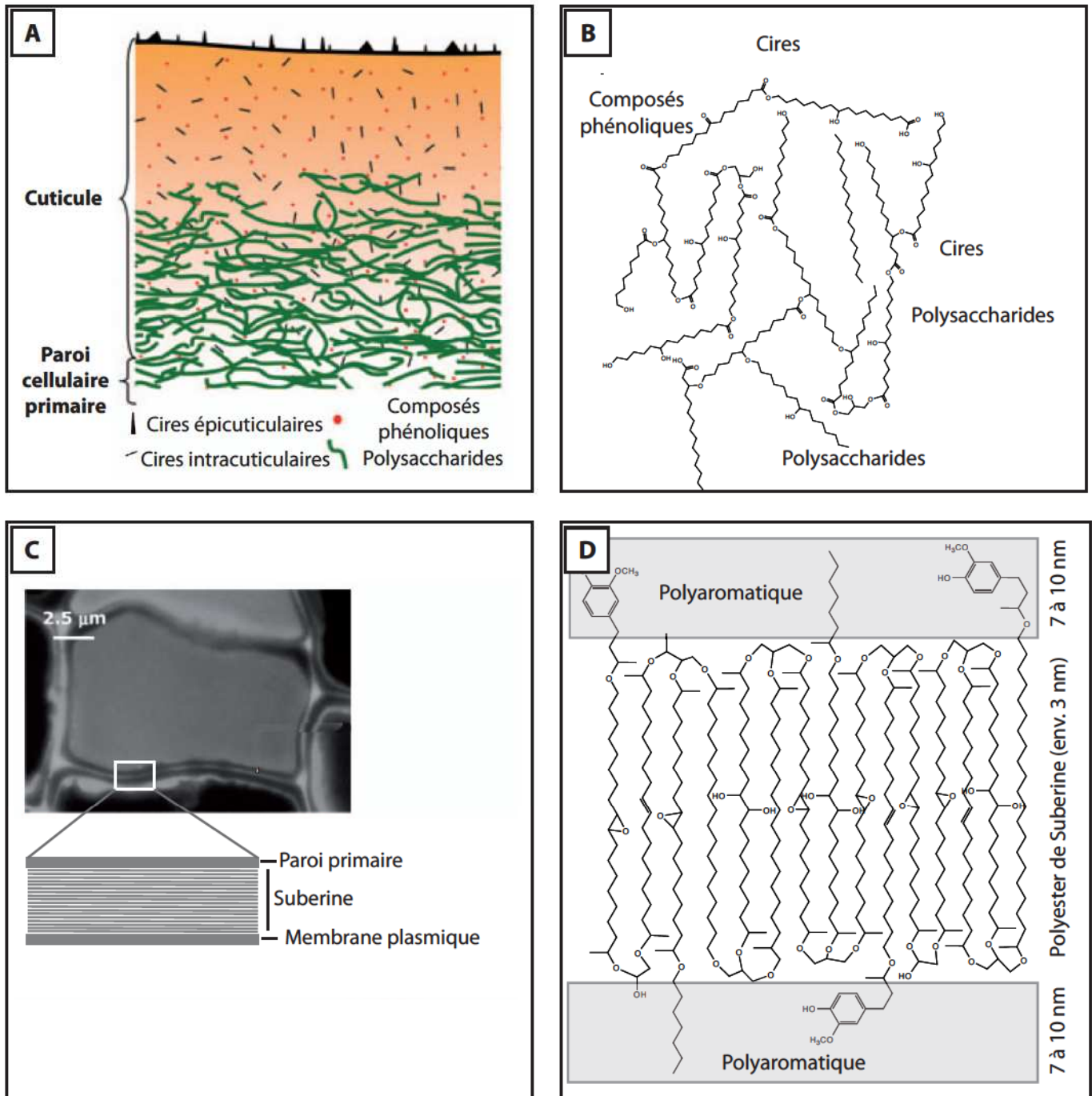


Figure I.27 Représentation schématique de la composition des polymères de cutine et subérine.

A. Schéma représentant l'organisation de la cuticule au niveau cellulaire.

B. Modélisation des liaisons au sein de la cuticule. Les acide gras polyhydroxylés sont pontés par des liaisons esters. La présence de glycérol, cires, polysaccharides et composés phénoliques est également représentée.

C. Observation par microscopie électronique à transmission d'une coupe de subér. Un agrandissement schématisé du polymère de subérine révèle la présence d'une structure lamellaire avec une alternance de couches translucides (30Å) et denses aux électrons (70-100Å). Des analyses par lumière polarisée ont révélé la présence des structures perpendiculaires au sein des couches translucides.

D. Modèle de polymérisation de la subérine. Pour expliquer les données observées en C, il a été proposé que le domaine aliphatique corresponde au domaine translucide et que les monomères soient orientés de façon perpendiculaire. Une monocouche de diacides ancrés aux deux extrémités par du glycérol correspondant parfaitement à la taille du domaine translucide. Celui-ci serait relié par des acides férulique au domaine polyaromatique et des chaînes aliphatiques traverseraient ce dernier pour relier les différents domaines aliphatiques entre eux. Des liaisons intra- et inter-chaîne peuvent exister entre les fonctions oxygénées intrachaines. D'après Dominguez et al., 2010; Graça and Santos, 2007.

monoacylglycérol. La répétition de cette transestérification permet de former une chaîne linéaire d'acides gras terminée par une molécule de glycérol. L'enzyme étant extracellulaire, il apparaît que les précurseurs de la cuticule sont transportés sous forme de monomères et polymérisés à l'extérieur de la cellule.

3.2.5. Les liaisons chimiques au sein du polymère

La cutine est un polymère formé de liaisons C-C aliphatiques en majorité (permettent une rotation libre) et esters (rigides). Le polymère formé est donc flexible et résistant aux tensions mécaniques (Matas and Heredia, 1999). Cela permet la formation de petites cavités dans lesquelles se logent les composés phénoliques (Dominguez et al., 2011) et où peuvent diffuser les composés échangés avec le milieu extérieur.

3.3. La subérine

3.3.1. Localisation et fonctions

Le dépôt de subérine forme une ou plusieurs couches le plus souvent sous la paroi primaire des cellules de l'endoderme racinaire (figure I.25b). La subérine permet de contrôler les échanges de gaz, d'eau et d'ions avec l'environnement et sa synthèse est également déclenchée lors de l'attaque de certains micro-organismes phytophages afin de protéger les tissus encore sains. On trouve ainsi de la subérine au niveau du périoderme des racines et des tiges suite à la croissance secondaire des méristèmes. Elle est également déposée sous la paroi des cellules de l'hypoderme et endoderme des racines primaires (figure I.25c) et des cellules entourant le système vasculaire des feuilles de monocotylédones.

3.3.2. Composition et nature des monomères

Nous savons aujourd'hui que la subérine est formée de deux domaines liés et souvent répétés. Cette répétition serait à l'origine de l'observation d'une structure lamellaire au microscope électronique à transmission (figure I.27C). Le premier est de nature polyaromatique et formé d'acides hydroxycinnamiques (fêrulique en majorité) (Bernards, 2002). Ceux-ci sont liés par covalence les uns aux autres de manière analogue aux monolignols de la lignine et sont vraisemblablement impliqués dans la liaison aux

polysaccharides de la paroi cellulaire végétale, à la membrane plasmique et au second domaine, un polyester aliphatique (figure I.27D; Kögel-Knabner et al., 1989). Ce polyester est constitué principalement d'acides gras (C18-C24), d' ω -hydroxy-acides (C16 à C26) et de α,ω -di-acides (C16 à C26) (figure I.25c; Pollard et al., 2008). Franke *et al.* (Franke and Schreiber, 2007) rapportent que le glycérol a également été identifié comme composant majeur dans la subérine et joue un rôle critique dans la formation tridimensionnelle du polymère (Bernards, 2002). Enfin, il a été constaté que des cires, formées de monomères très semblables à ceux des cires de la cuticule, sont déposées dans la subérine du périoderme mais pas des parois de l'hypo- ou endo-derme racinaire.

3.3.3. Stockage/transport des monomères

Les acides hydroxycinnamiques sont formés et transportés de façon similaire aux monomères de lignine et les précurseurs du polyester aliphatiques comme les monomères de cutine. Les acides gras plastidiaux sont allongés et/ou couplés au CoA. Ces intermédiaires de biosynthèse sont alors modifiés par des CYP450 et FAR localisées au sein du RE (Ranathunge et al., 2011) et sécrétés dans l'espace périplasmique (figure I.26).

3.3.4. Polymérisation des monomères

Plusieurs études ont mis en évidence la formation d'esters d'acides gras avant polymérisation. GPAT5 (glycerol-3-P acyltransferase 5) transfère des acides gras sur le glycérol (Yang et al., 2010), HHT (hydroxycinnamoyl-CoA:co-hydroxypalmitic acid O-hydroxycinnamoyltransferase) et ASFT (Aliphatic Suberin Feruloyl Transferase) sur l'acide férulique (Lotfy et al., 1995; Molina et al., 2009). Les précurseurs acyl-glycérol, acyl-ferulate seraient alors incorporés à la subérine par des enzymes de la famille des α,β -hydrolases (lipases, cutinases, estérases et hydrolases) et peroxydases (Bernards et al., 2004; Kurdyukov et al., 2006) en commençant par la fixation d'un domaine aromatique à la membrane plasmique (Lotfy et al., 1995; Molina et al., 2009). Ce domaine permettrait l'ancrage du polyester lipidique et la répétition de ces domaines aromatiques et lipidiques serait responsable de l'aspect lamellaire de la subérine qui peut être observée au microscope électronique à transmission (figure I.27D).

3.3.5. Les liaisons chimiques au sein du polymère

Selon le modèle de Graca and Santos (2007), le domaine aromatique est organisé par des liaisons C-C et éthers, et relié par des liaisons esters au polyester organisé autour des molécules de glycérol. Les fonctions OH libres du polyester responsables d'interactions intra ou inter-chaînes déterminent l'espacement entre les chaînes. Le polymère formé est rigide et imperméable au passage de solutés à l'exception des tissus racinaires où les cires responsables de cette imperméabilité sont absentes (Waduwara et al., 2008).

3.4. L'exine

3.4.1. Localisation et fonctions

La sporopollénine est le constituant majeur de l'exine (Scott et al., 2004). Il est à ce jour le biopolymère végétal le plus résistant identifié. La sporopollénine est trouvée dans les parois du pollen des spermatophytes, dans les spores des mousses, des fougères, de quelques algues vertes et dans l'endospore de certaines bactéries (Delwiche et al., 1989; Dominguez et al., 1999). Le polymère semble être apparu juste avant la colonisation des milieux secs et est devenu ubiquitaire chez les plantes terrestres. Sa remarquable conservation chimique au cours de l'évolution souligne le rôle central de ce polymère dans la reproduction des plantes terrestres. Il confère en effet au grain de pollen une exceptionnelle protection mécanique, une inertie chimique et une grande résistance aux attaques biologiques. L'exine sert également d'armature rigide pour le manteau et maintient la pression de turgescence du pollen (Ariizumi and Toriyama, 2011).

3.4.2. Composition et nature des monomères

Les composants du polymère ont été recherchés par différentes méthodes au cours des dernières décennies. La première a consisté à extraire et dégrader de façon ménagée le polymère en monomères puis à caractériser ceux-ci. Du fait de la haute résistance du polymère, les traitements de dépolymérisation à appliquer sont rudes. Une littérature abondante décrit la présence de certains éléments qui ont résisté aux traitements mais les produits utilisés sont tellement corrosifs qu'ils peuvent produire des modifications chimiques non prévisibles et fausser les résultats. Les études les plus récentes ont consisté à solubiliser et

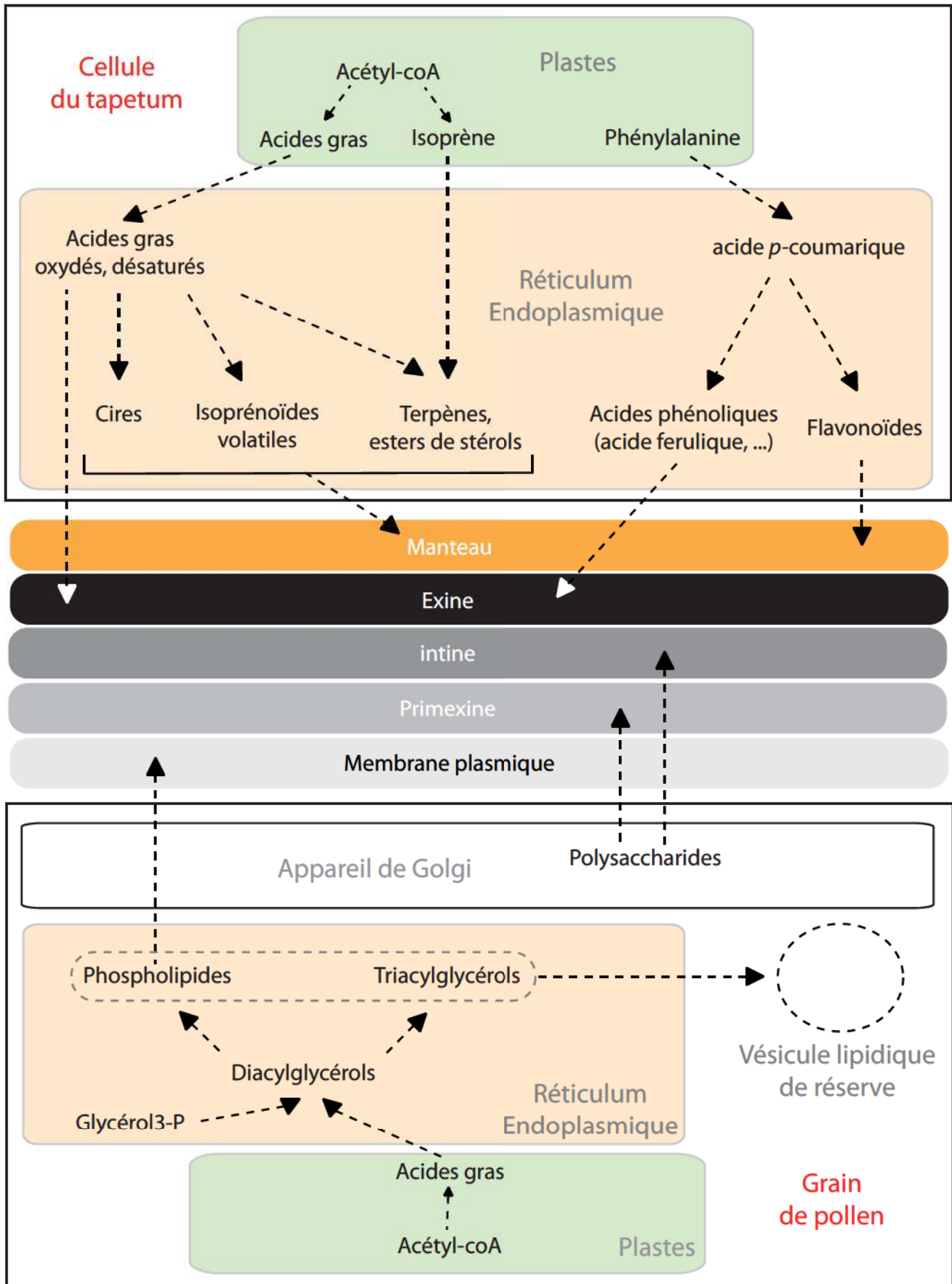


Figure I.28 Nature et origine biosynthétique des précurseurs de la paroi pollinique.

Une littérature abondante retraçant l'étude de la composition de la paroi pollinique par dégradation ménagée, l'utilisation de traceurs et d'inhibiteurs ou l'étude de mutants touchés dans l'exine ont permis d'identifier la nature et l'origine biosynthétique des précurseurs des différents polymères composant la paroi pollinique. Les cellules du tapetum synthétisent les précurseurs nécessaires à la formation de l'exine et du manteau. Les microspores (grains de pollen) produisent les monomères impliqués dans la formation de la primexine et de l'intine.

dépolymériser la sporopollénine par méthanolyse acide, par l'utilisation de pipéridine ou de 2-aminoéthanol. L'analyse des fragments par résonance magnétique nucléaire (RMN) (Ahlers et al., 2003; Ahlers et al., 1999), chromatographie gazeuse à thermochemolyse (pyGC-MS) (Rozema et al., 2009; Rozema et al., 2001) ou Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FITR) (Dominguez et al., 1999; Watson et al., 2007), indique qu'il s'agit d'un polymère aliphatique associé à des phénols hydroxylés (figure I.28).

Un autre type d'expérience a consisté à suivre l'incorporation ou non de précurseurs marqués comme la phénylalanine, l'acétate ou le glucose et a conduit à penser que la présence de composés phénoliques était indispensable à la formation du polymère.

Parallèlement, l'utilisation d'inhibiteurs de synthèse a permis de confirmer l'implication du métabolisme lipidique. Le traitement par un herbicide visant à inhiber les enzymes de synthèse des acides gras à très longues chaînes, par exemple, a entraîné une diminution de la taille des chaînes aliphatiques de composés lipidiques de la sporopollénine et modifié la structure du polymère (Wilmesmeier and Wiermann, 1995).

Une quatrième voie d'étude originale a été publiée. Une équipe a tenté d'utiliser un insecte se nourrissant des composés de la paroi pollinique pour en analyser les monomères. (Luo et al., 2011). Les insectes se nourrissent habituellement des lipides de surface du pollen ou de l'intérieur du grain de pollen accessible par les pores germinatifs, mais l'insecte utilisé dans l'étude (*Gelechiidae*) est capable de dégrader la sporopollénine. La phosphatidyl-éthanolamine, un précurseur de l'éthanolamine, a été trouvé dans l'hémolymphe de l'insecte. L'éthanolamine, utilisé par les palynologistes pour dissoudre la sporopollénine en laboratoire, serait un bon candidat pour expliquer cette dégradation biologique. Mais cette méthode de recherche n'a pour l'instant pas apporté de résultats.

Enfin, comme nous l'avons vu précédemment, les dernières avancées ont été réalisées par l'identification de mutants mâles stériles touchés spécifiquement dans le développement pollinique (Scott et al., 2004). Différents auteurs ont ainsi constaté qu'un grand nombre des gènes mutés codaient pour des enzymes impliquées dans le métabolisme lipidique (Piffanelli et al., 1997) ou des phénylpropanoïdes (Ahlers et al., 2003; Bubert et al., 2002; Guilford et al., 1988; Scott et al., 2004).

Les enzymes impliquées dans la synthèse d'acides gras à longue chaîne polyhydroxylée sont nombreuses (figure I.29). Parmi les enzymes plastidiales, la pyruvate déshydrogénase (PDH) est impliquée dans la synthèse des précurseurs d'acides gras et MS2 forme l'hexadécanol à partir de C16-ACP (Aarts et al., 1997; Chen et al., 2011). Dans le

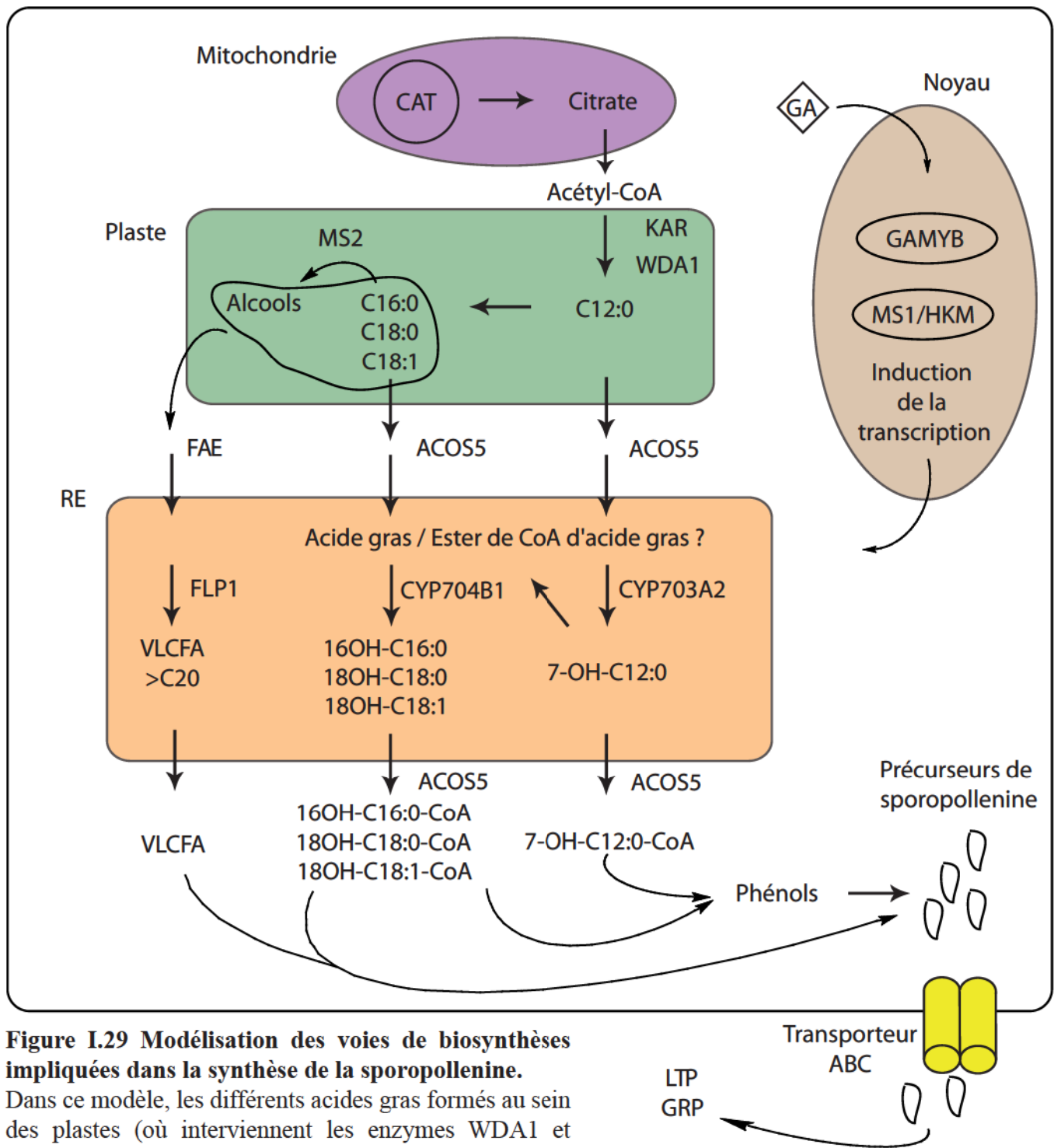


Figure I.29 Modélisation des voies de biosynthèses impliquées dans la synthèse de la sporopollénine.

Dans ce modèle, les différents acides gras formés au sein des plastes (où interviennent les enzymes WDA1 et KAR) sont modifiés par ACOS5 pour permettre leur transport vers le RE. Les esters de coA sont alors hydroxylés par les CYP 703A2 et CYP 704B1 après une possible action de thioestérase spécifique.

Les produits seraient alors ré-estérifiés au CoA par ACOS5 pour former des précurseurs de sporopollénine qui pourront être reliés par des liaisons esters ou éthers (Morant et al., 2007). Le transport des précurseurs se fait en deux étapes; la sortie vers l'espace apoplasmique (probablement au moyen d'un transporteur ABC) puis le convoiement des précurseurs vers les microspores en développement. Cette dernière étape pourrait impliquer des GRPs ou LTPs. Dans ce modèle, la synthèse et perception de Gibbéréline permet la synthèse des protéines impliquées dans la production des monomères de sporopollénine. CAT, cycle des acides tricarboxyliques; KAR, β -Ketoacyl reductase; WDA1, Wax deficient anther1; ACOS5, Acyl-CoA synthetase 5; FAE, Fatty acid elongase; FLP1, Faceless pollen1; VLCFA, Acides gras à longue chaîne; CYP704B1, Cytochrome P450 704B1; CYP703A2, Cytochrome P450703A2, GA, Gibbérélines; GAMYB, facteur de transcription à domaine MYB; MS1/HKM, male sterility1/Hackly microspore; MS2, Male sterility2; LTP, Lipid transfert protein; GRP, Glycine rich protein.

cytoplasme, l'acyl-CoA synthétase ACOS5 active un large panel d'acides gras en leurs esters de CoA correspondants. A proximité du réticulum endoplasmique, les CYP703A2 et CYP704B1 (Dobritsa et al., 2009a; Morant et al., 2007) hydroxylient différents acides gras en position 7 ou ω respectivement. Enfin, toujours au niveau du RE et d'après l'analyse des profils métaboliques, les enzymes WDA1 (Jung et al., 2006) et FLP1 (Ariizumi et al., 2003) sont impliqués dans le métabolisme des acides gras à longue chaîne. Même si, *in vitro*, MS2, ACOS5, CYP703A2 et CYP704B1 ont parfois été testés sur des acides gras différents, les profils d'expression spatiotemporels des gènes et le phénotype des mutants correspondants sont similaires. Ces enzymes pourraient faire partie de la même voie de biosynthèse et des analyses phénotypiques de mutants confirment cette hypothèse. La structure de l'exine du pollen du mutant *cyp704b1* est plus perturbée que celle du mutant *cyp703a2*. Théoriquement, si les deux protéines interviennent dans deux voies de biosynthèse différentes, on pourrait s'attendre à ce que la structure de l'exine du double mutant *cyp703a2 cyp704b1* soit encore plus perturbée. Une étude a révélé que le phénotype du double mutant *cyp703a2 cyp704b1* est identique à celui du simple mutant *cyp704b1* ce qui implique que les CYP703A2 et CYP704B1 font probablement partie de la même voie métabolique (Dobritsa et al., 2009b). Les grains de pollen des mutants *ms2* et *acos5* sont dépourvus d'exine.

Les autres constituants importants de la sporopollénine sont les phénylpropanoïdes. En effet, le tapétum est le tissu de l'anthère où les enzymes impliquées dans le métabolisme des phénylpropanoïdes ont la plus forte activité (Piffanelli et al., 1998). Ceci a été confirmé par l'immunolocalisation des enzymes PAL et CHS dans les cellules du tapétum (Piffanelli et al., 1998). L'extinction de ces gènes dans les cellules du tapétum par silencing entraîne la stérilité des plantes du fait d'un développement anormal des grains de pollen (Matsuda et al., 1996; Van der Meer et al., 1992). Les composés phénoliques formés semblent donc impliqués dans la constitution de la paroi pollinique. Certaines enzymes impliquées dans la synthèse de flavonols comme la flavanone 3-hydroxylase chez *Zea mays* sont fortement exprimées lors du développement de l'anthère et il a été possible d'identifier la présence de kaempferol, luteolin, quercetin, glucoside-rhamnoside, isorhamnetin-glucoside dans l'exine de certaines plantes (Dobritsa et al., 2011). Cependant les flavonoïdes ne semblent pas essentiels aux grains de pollen chez toutes les plantes comme il avait été découvert chez le pétunia (Mo et al., 1992). Le mutant *tta-1* d'*Arabidopsis*, déficient pour la CHS, ne synthétise plus de flavonoïdes mais ne présente pas de défaut de développement du pollen (Shirley et al., 1995).

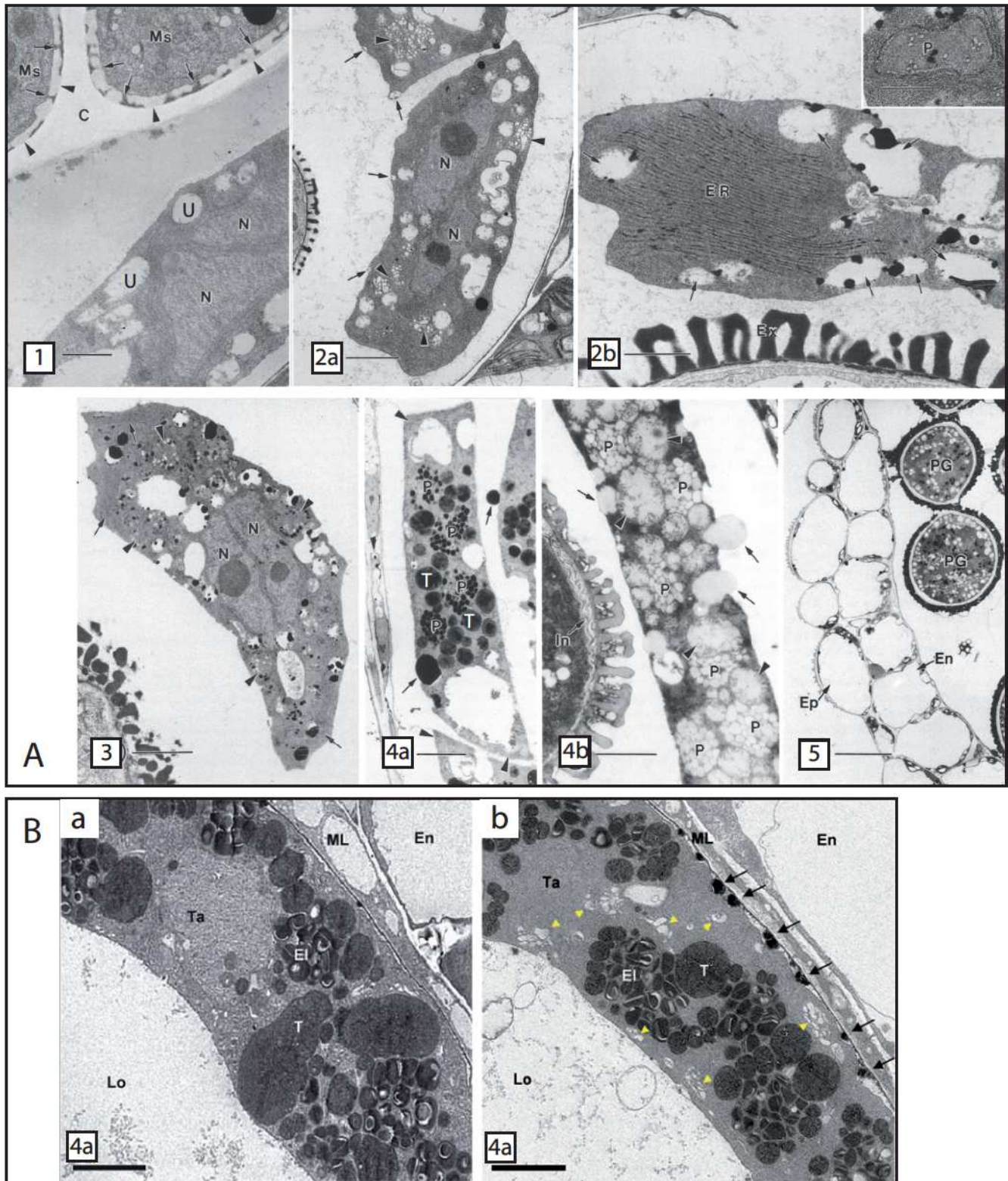


Figure I.30 Le transport des monomères de sporopollénine et du manteau à partir des cellules du tapétum.

A. Divers composants de la paroi pollinique sont transportés par différentes vésicules (voir flèches) en fonction du stade de développement et donc de la partie de paroi pollinique en construction. Leur rôle exact reste hypothétique. C, callose; En, endothelium; Ep, épiderme; ER, réticulum endoplasmique; Ex, exine; Ms, microspore; N, noyau; P, plastes (elaioplastes); U, pro-ubish bodies; T, tapetosomes.

B. Le transport des monomères de sporopollénine pourrait également nécessiter l'intermédiaire d'un transporteur ABC (ABCG26). La perte de sa fonction entraîne l'accumulation de vésicules (voir flèches) chez le mutant *abcg26* (b) en comparaison d'une plante sauvage (a) au même stade de développement (début stade microspore bicellulaire). L'aspect des vésicules est similaire à celui de l'exine. T, tapetosomes; Ei, élaïoplastes; Lo, locule; ML, cellule de la couche moyenne. 1 stade tétrade, 2a stade microspore libre précoce, 2b stade microspore libre tardif, 3 stade microspore polarisée, 4a stade microspore bicellulaire, 4b stade microspore bicellulaire tardif, 5 stade microspore tricellulaire. D'après Owen et Makaroff, 1995; Choi *et al.*, 2011.

Métabolismes associés au développement de la paroi du pollen

La composition de l'exine se rapprocherait donc davantage de celle de la subérine que de la lignine ou la cutine par exemple (figure I.29).

3.4.3. Stockage/transport des monomères

Il existe deux types de tapétum : celui de type sécrétoire et celui de type amoéboïde. Dans le premier, les cellules forment un tissu (syncytium) entourant les microspores en développement. Dans le second, les cellules du tapétum s'individualisent et se mêlent aux microspores en développement (Huysmans, 1998). Les substances produites par ce tissu nourricier parviennent selon deux processus aux microspores en développement. Pour le tapétum de type sécrétoire, les métabolites sont transmis par l'intermédiaire du liquide loculaire alors que pour le second type, ils sont transférés par contact cytoplasmique (Pacini et al., 1985). Dans le cas du tapétum de type sécrétoire, la paroi cellulaire primaire disparaît (plus ou moins en fonction de l'espèce) au cours du développement du pollen. C'est le cas pour *Arabidopsis* chez qui, la paroi a entièrement disparu au stade tétrade. Le transport des monomères de sporopollénine peut donc être découpé en deux étapes. L'étape de sécrétion consiste à transférer les précurseurs au-delà de la membrane plasmique (dans l'espace apoplastique). L'étape de translocation consiste à amener les précurseurs de cet espace apoplastique à la surface des microspores (et donc à traverser la paroi primaire le cas échéant).

Hypothèse 1 : couplage sécrétion/translocation médié par des vésicules

Très tôt dans l'étude de la formation de l'exine, un rôle prééminent des cellules du tapétum a été suggéré par des études ultrastructurales (Heslop-Harrison, 1963) et en particulier par l'observation de corps lipidiques sphériques appelés orbicules ou Ubisch bodies (figure I.30) dans le locule. Ces gouttelettes naissent à partir du RE et ne sont présentes que dans les tapétum de type sécrétoire. Deux stades de maturation ont pu être constatés ; les pro-Ubisch bodies et les Ubisch bodies. Chez les Brassicacées, les pro-Ubisch bodies semblent être relâchés sans maturation supplémentaire (Piffanelli et al., 1998). Chez les autres espèces, comme le riz, dont les parois primaires persistent à l'extérieur des cellules du tapétum, ils mûrissent en Ubisch bodies et deviennent denses aux électrons jusqu'à avoir l'aspect de la sporopollénine. Ces deux types de vésicules, pro et Ubisch-bodies, sont relâchées dans le locule, s'accumulent aux abords de la paroi de callose, la traversent et se

retrouvent en contact avec le polymère en formation juste après la fin de la méiose (Ariizumi and Toriyama, 2011). La protéine RAFTIN a été identifiée au sein de ces vésicules dans les cellules du tapétum de riz (Wang et al., 2003). Sa mutation entraîne la formation de grains de pollen aplatis et dégénérés en fin de maturation. Ces vésicules pourraient constituer le moyen de transport des monomères aliphatiques, et la protéine RAFTIN intervenir dans la fixation du polymère sur le grain de pollen (figure I.30A).

Hypothèse 2 : sécrétion et translocation en deux phases

La sécrétion

Dans la fonction du transport de molécules au travers d'une membrane, la famille des transporteurs ABC joue un rôle important. Les membres de cette famille sont nombreux et le panel de substrats potentiels est vaste. Plusieurs transporteurs ABC sont exprimés lors du développement de l'anthere. Parmi ceux-ci, le transporteur ABCG26 a été caractérisé et sa mutation conduit à la stérilité de la plante (figure I.30B). Chez les plantes *abcg26*, une accumulation de vésicules denses aux électrons est constatée au début du stade de microspore bicellulaire mais sans pouvoir prouver qu'elles contenaient des monomères d'exine (Choi et al., 2011; Quilichini et al., 2010).

La translocation

Une fois dans l'espace apoplastique, les précurseurs pourraient également être pris en charge par des GRPs (glycine rich proteins) ou des LTPs (Lipid Transfer Protein). Plusieurs membres de la famille des LTPs sont exprimés dans les cellules du tapétum, contiennent un peptide signal de sécrétion et une poche capable de fixer des acides gras à longue chaîne. Ils pourraient donc permettre la translocation des monomères. Un mutant dérégulé dans l'expression d'une LTP et affecté dans la formation de l'exine a d'ailleurs été identifié (Zhang et al., 2010). La protéine OsC6 est retrouvée dans de nombreux tissus de l'anthere et son absence cause des défauts de développement des corps d'Ubish et de l'exine. Son substrat et rôle exact n'ont pas encore été identifiés.

Les GRPs partagent de nombreuses propriétés avec les LTPs (Ariizumi and Toriyama, 2011) et nombreuses sont celles qui sont retrouvées au sein du locule (Huang et al., 2009). Le mutant *grp92* présente des grains de pollen dont l'exine est fine et désorganisée par rapport à celle d'un grain de pollen sauvage. La protéine est retrouvée, sur l'exine, les orbicules et la

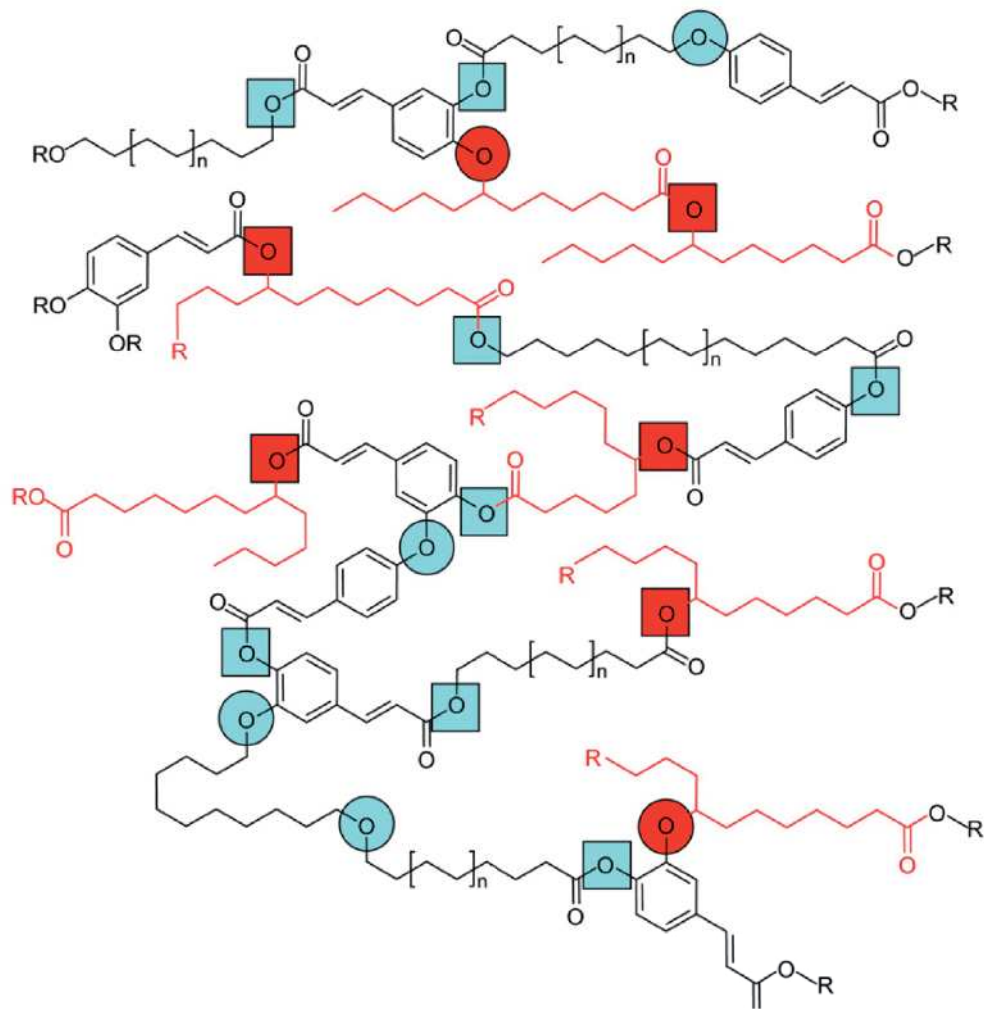


Figure I.31 Modélisation du polymère de sporopollenine.

Les acides gras oxygénés (en rouge) et phénylpropanoïdes (en noir) synthétisés dans les cellules du tapetum forment un polymère maintenu par des liaisons esters (surlignées par un carré) ou éthers (surlignées par un rond).

D'après Morant *et al.*, 2007.

paroi de callose (McNeil and Smith, 2010). Il semble donc que cette protéine puisse faciliter le dépôt d'exine au stade tétrade et permettre la formation des baculae et du pro-ectum.

3.4.4. Polymérisation des monomères

La polymérisation de la sporopollénine reste mystérieuse notamment parce que l'on ne connaît toujours pas précisément les monomères qui la structurent. Malgré tout, il a pu être constaté que la primexine semble servir de précurseur à la sexine en guidant ou initiant la polymérisation des monomères grâce à des protéines SAP y résidant (sporopollenin acceptor particles) (Ariizumi and Toriyama, 2011). La sporopollénine étant formée de dérivés d'acides gras et de phénylpropanoïdes, il a été proposé que la polymérisation implique des enzymes comme des acyltransférases comme pour la cuticule ou bien des peroxydases par analogie à la polymérisation de la lignine ou la subérine (Scott et al., 2004). Des protéines appartenant à ces deux familles sont d'ailleurs exprimées lors du développement de la paroi pollinique.

3.4.5. Les liaisons chimiques au sein du polymère

D'après ce que l'on sait des monomères de sporopollénine par des études non destructives (Bubert et al., 2002) et à partir des connaissances sur des polymères analogues, un modèle de polymère a été proposé (figure I.31; Morant et al., 2007). Celui-ci présente un réseau réticulé composé d'acides gras hydroxylés ou non, pontés par des liaisons ester ou éther à d'autres dérivés d'acides gras ou de phénylpropanoïdes.

3.5. Le manteau pollinique

3.5.1. Nature et fonction des composants

Le manteau pollinique, aussi nommé pollenkit ou tryphine chez les Brassicaceae, recouvre les espaces entre les baculae à la surface de l'exine. Il représente 10-15% de la masse totale du pollen (Piffanelli et al., 1997). Contrairement à l'exine, les composants du manteau pollinique sont extractibles par un solvant organique (cyclohexane) sans solubiliser les lipides intracellulaires du grain de pollen (Doughty et al., 1993). De ce fait, il a été extensivement caractérisé, notamment chez les *Brassicacées* et ces analyses ont révélé la présence de composés lipidiques et protéiques (Doughty et al., 1993; Fiebig et al., 2004;

Mayfield et al., 2001; Mayfield and Preuss, 2000; Murphy and Ross, 1998; Preuss et al., 1993; Ross and Murphy, 1996). Il contiendrait également des composés volatiles permettant d'attirer des insectes pollinisateurs (Piffanelli et al., 1998).

Parmi les composés lipidiques, on trouve des alcanes, des esters non-polaires d'acyles saturés comme des triterpènes ou des esters de stérols (Piffanelli et al., 1998). Les alcanes et esters de stérols du manteau rendraient le pollen imperméable et maintiendraient le manteau pollinique sous forme semi-rigide en piégeant les protéines et autres substances qu'il contient tout en maintenant une certaine fluidité. Des acides gras à longues chaînes et très longues chaînes parfois sous la forme de cires ont également été identifiés (Preuss et al., 1993). Les acides gras seraient importants au cours de l'interaction du pollen avec le stigmate, étant à la fois des molécules signal et favorisant l'adhésion aux pollinisateurs par ses propriétés adhésives (Boavida et al., 2005; Pruitt et al., 2000). Le pollen de plusieurs mutants *eceriferum* (*cer*) d'*Arabidopsis*, affectés dans la synthèse des acides gras à très longue chaîne, n'initie pas les processus d'hydratation lorsqu'il est placé sur le stigmate, mais est capable de germer normalement *in vitro* (Preuss et al., 1993). Des dérivés du métabolisme des phénylpropanoïdes sont également trouvés, comme les flavonoïdes et phénolamides (Grienenberger et al., 2009). Les flavonoïdes seraient impliqués dans la protection face aux UVs, en limitant la formation des radicaux libres (Pacini and Hesse, 2005; Schijlen et al., 2004; Winkel-Shirley, 2001), et contre les pathogènes (Dickinson, 2000; Zinkl et al., 1999) augmentant ainsi la longévité du grain de pollen.

Les protéines majoritaires retrouvées dans le manteau sont des glycoprotéines, de petites protéines comme les oléosines (Piffanelli et al., 1997; Preuss et al., 1993), des endoxylanases et des glucanases chez le maïs, toutes synthétisées par le tapétum. Les oléosines, étant amphiphiles, joueraient le rôle d'émulsifiant (Hsieh and Huang, 2004) et permettraient le pompage de l'eau contenue dans le stigmate lors de la germination du pollen (Mayfield and Preuss, 2000). Les endoxylanases et glucanases participeraient à la pénétration du tube pollinique en hydrolysant la paroi des cellules du stigma (Bih et al., 1999; Suen et al., 2003). Des « lipid transfer proteins » (LTP) sont également constitutives du manteau pollinique. Ce sont des petites protéines, solubles et basiques, qui *in vitro* sont connues pour favoriser le transfert des phospholipides à travers les membranes. Elles sont capables de fixer les acyl-CoA et les acides gras et permettraient leur sécrétion et dépôt sur la paroi ou le manteau. Leur forte expression dans le tapétum, laisse supposer un transport de matériel lipidique du tapétum vers la microspore pour la formation de la paroi et/ou du manteau (figure I.8).

3.5.2. Stockage et transport des constituants

Il semble qu'au début de la formation du manteau, les flavonoïdes et lipides neutres soient exportés à la surface des cellules du tapétum selon un mécanisme proche de celui de la sécrétion des lipides dans les cellules épidermiques c'est à dire au moyen d'un transporteur ABC (Pighin et al., 2004). Puis les composés formés seraient stockés au sein de vésicules, les élaïoplastes et tapétosomes, dont l'accumulation peut être observée dans le tapétum dès la première mitose pollinique jusqu'à la fin du développement du pollen (figure I.8 image 3 à 4b). Leur contenu serait alors relâché dans le locule lors de la mort cellulaire programmée des cellules du tapétum (figure I.8 image 4b).

Les élaïoplastes dérivent de plastides qui ont peu à peu accumulé des granules d'amidon puis des gouttelettes lipidiques qui les ont remplacées. Ces structures sont donc des plastides spécialisés dans le stockage temporaire d'esters de stérols encapsidés dans une coque protéique formée de protéine PAP (plastid lipid-associated protein) (Platt et al., 1998; Wu et al., 1999).

Les tapétosomes sont des organelles uniquement présents dans le tapétum des plantes (Hsieh and Huang, 2005; Wu et al., 1997) qui contiennent des gouttelettes lipidiques formées d'une matrice de lipides neutres (surtout des triacylglycérols et des alcanes) entourée de phospholipides et d'oléosines. Les tapétosomes renferment également des vésicules membranaires qui contiennent des flavonoïdes et calréticulines, une protéine associée à la membrane.

3.5.3. Biogénèse du manteau et liaisons

Le manteau se dépose entre les baculae formant un mélange hétérogène, puis, lors des étapes de déshydratation, il forme une surface homogène maintenue par un ensemble d'interactions hydrophobes et ioniques et recouvert d'une membrane phospholipidique. Le fait que le dépôt soit uniforme suppose la présence de points de fixation dont les propriétés pourraient jouer un rôle attracteur ou guider le dépôt par capillarité. Le dépôt préalable d'un matériel fibrillaire a pu être observé chez *Raphanus*, *Lilium*, *Olea* ou *Arabidopsis* (Owen and Makaroff, 1995).

3.6. Spécificités du polymère de sporopollénine

La composition chimique et les liaisons entre monomères définissent les propriétés des polymères que nous avons étudiés. De façon générale, les cires sont responsables de l'imperméabilisation alors que les composés phénoliques rigidifient les parois. Des liaisons C-C sont résistantes mais confèrent une certaine flexibilité alors que des liaisons esters sont rigides. La proportion de ces différentes liaisons dans le polymère influencera la rigidité du polymère. La réticulation du polymère est également importante. La présence de fonction cétones ou hydroxyles libres permet la mise en place de liaisons Hydrogènes entre chaînes de polymères. Ces liaisons sont faibles et à l'origine de l'élasticité des polysaccharides alors que les liaisons covalentes entre chaînes comme dans la lignine rigidifient le polymère.

Les plantes contrôlent les échanges avec le milieu environnement et s'en protègent par l'intermédiaire des polymères. En fonction de leurs caractéristiques et des pressions de sélection, ils recouvrent certains tissus du sporophyte.

Cette spécialisation tissulaire n'existe pas dans le cas du grain de pollen. Tous les stress s'appliquent sur la même structure, la paroi pollinique, qui semble combiner les propriétés de ces différents polymères. A la fois imperméable et résistante aux pressions mécaniques ou corrosions chimiques, elle permet la fixation aux insectes ou au stigma. De ce fait, la composition en monomères et la réticulation du polymère sont analogues à celles composant la lignine, subérine et cuticule mais certaines spécificités sont à prévoir. Pour identifier et caractériser les monomères et enzymes à l'origine de ce polymère il faut tenir compte de ces critères.

MATERIELS ET METHODES

I. Méthodes de clonages de l'ADN

L'ensemble des tampons et milieux ainsi que les techniques de base sont décrits dans l'ouvrage de référence de J. Sambrook (Sambrook and Russel, 2001). Les digestions, les ligations et réactions de recombinaison des fragments d'ADN ont été réalisées conformément aux recommandations des fabricants.

1. Préparation de l'ADN en vue d'un clonage

1.1. Amplification des fragments d'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Cette technique permet l'amplification exponentielle de fragments d'ADN (Sambrook and Russel, 2001). L'amplification se fait *in vitro* grâce à l'utilisation d'ADN polymérase thermostables optimisées, dérivées de l'ADN polymérase de la bactérie *Thermus brockianus* et de deux amorces oligonucléotidiques capables de s'hybrider à des régions flanquant la séquence à amplifier. Les amorces peuvent porter à leur extrémité 5' des séquences additionnelles correspondant à des sites de restriction. L'ajout de ces sites permet l'insertion ultérieure des fragments PCR dans le vecteur de clonage. Les conditions générales de l'amplification selon les polymérase utilisées sont :

	Génotypage et criblage de colonies : Utilisation du Kit GoTaq de Proméga		Clonage : Utilisation du Kit Phusion Master Mix de FinnZymes	
	Volumes pour 20 µL de réaction	Concentration/ quantité finale	Volumes pour 20 µL de réaction	Concentration/ quantité finale
Matrice d'ADN	2 µL	150 ng	2 µL	150 ng
Oligo sens (100 µM)	0.1 µL	0.5 µM	0.1 µL	0.5 µM
Oligo antisens (100 µM)	0.1 µL	0.5 µM	0.1 µL	0.5 µM
MgCl ₂ (25 mM)	2 µL	2.5 mM	Phusion Master Mix 2x 10 µL	
dNTP (10 mM)	2µL	1 mM		
Tampon x5	4 µL	1x		
ADN polymérase	0.1 µL	1 U		
eau	qsp 20 µL		qsp 20 µL	

La réaction de PCR se déroule selon les conditions générales suivantes :

	GoTaq Criblage de colonies	GoTaq Génotypage	Phusion Master Mix Clonage des CDS	
Dénaturation	4 min à 95°C	2 min à 95°C	2 min à 98°C	Cycle répété n fois en fonction de l'expérience considérée
Dénaturation	10 sec à 95°C	30 sec à 95°C	10 sec à 98°C	
Hybridation	10 sec à Tm	30 sec à Tm	10 sec à Tm + 3°C	
Elongation	72°C ,1 min par kb			
Elongation finale	72°C ,2 min par kb			

L'hybridation se fait à une température Tm calculée en fonction du nombre de paires A/T et G/C de l'amorce selon la formule :

$$T_m = 69,3 + 0,41 \times (\%GC) - (650 / \text{taille de l'amorce en bases})$$

L'étape d'élongation dépend de la taille du fragment à amplifier et du type de polymérase utilisé (1 kb/min en moyenne). Pour une amplification optimale des fragments d'ADN, 25 à 30 cycles de PCR sont généralement suffisants.

1.2. Purification phénol/chloroforme du fragment de PCR

Un volume de réaction de PCR est additionné de un volume de phénol/chloroforme/alcool isoamylique 25 ; 24 ; 1 (1/1 ; v/v) et mélangé vigoureusement afin de séparer les protéines et les acides nucléiques. Une centrifugation de 5 min à 10 000 g permet de séparer la phase organique de la phase aqueuse contenant les acides nucléiques. Les protéines sont à l'interface. Cette phase aqueuse est récupérée et traitée avec un volume de chloroforme, vortexée et centrifugée comme précédemment. La phase aqueuse est à nouveau récupérée et additionnée de 2,5 volumes d'éthanol ainsi que de 150 mM de NaCl qui permettra à l'ADN de précipiter. L'ensemble est vortexé et placé à - 20°C sur une période de 30 min à toute une nuit. L'ADN précipité est récupéré après centrifugation 20 min à 10 000 g et lavé dans un volume d'éthanol 70%. Le culot obtenu après centrifugation 10 min à 10 000 g est séché puis repris dans 20 µL d'eau stérile.

1.3. Digestion de l'ADN par des endonucléases de restriction et déphosphorylation du vecteur

Les enzymes de restriction coupent les molécules d'ADN (produits de PCR et vecteurs) au niveau de sites de reconnaissance spécifiques, et génèrent des fragments à extrémités cohésives 5' ou 3' sortantes ou à extrémités franches. La digestion d'1 µg d'ADN se fait en général pendant une incubation de deux heures à 37°C en présence de une à trois unités d'enzyme. Un quart d'heure avant la fin de la digestion, le vecteur est traité à la phosphatase alcaline (CIP 0,2 U pour 1 µg d'ADN) qui déphosphoryle les extrémités 5' phosphate libres, empêchant ultérieurement la ligation du vecteur sur lui-même.

1.4. Analyse des fragments d'ADN digérés sur gel d'agarose et purification

Les fragments d'ADN obtenus par digestion enzymatique sont analysés par électrophorèse en gel d'agarose pur dont le pourcentage (0,8 à 2%) varie selon la taille des fragments à analyser. Une partie ou l'ensemble de l'ADN encore présent dans la solution de digestion, est mis en suspension dans le tampon de charge (Tris-HCl 2 mM pH8, EDTA 10 mM, saccharose 5%, bleu de bromophénol 0,01%). L'ensemble est déposé sur un gel préparé dans du tampon TAE 1x ou 0,5x (1x : Tris acétate 40 mM pH 8, EDTA 1 mM). Après électrophorèse à 100 V dans le tampon TAE (0,5-1x), le gel est immergé dans un bain de bromure d'éthidium (BET) à 0,5 µg/ml pendant 10 min. Les fragments sont analysés sous lumière UV. Les bandes de gel contenant les fragments d'ADN que l'on désire isoler sont découpées, puis purifiées à l'aide du kit *NucleoSpin extract* (Macherey-Nagel).

1.5. Ligation rapide de l'insert et du vecteur

Le vecteur et l'insert purifiés sont ligués grâce à la T4 DNA ligase qui catalyse la formation d'une liaison phosphodiester entre les extrémités libres 3' hydroxyle et 5' phosphate des molécules d'ADN. La ligation s'effectue 10 min à température ambiante à l'aide du kit *Rapid DNA ligation* (Fermentas). Le milieu réactionnel (20 µL final) contient environ 50 ng de vecteur et environ 150 ng d'insert dans le tampon de ligation du kit en présence de 5 U de T4 DNA ligase.

1.6. Séquençage d'ADN

Le séquençage des plasmides recombinants a été réalisé par M. Alioua (service de séquençage de l'IBMP) selon la méthode de séquençage de Sanger (Sanger et al., 1977) où l'incorporation de didésoxynucléotides couplés à la rhodamine par la Taq DNA polymérase FS (Perkin-Elmer, Foster City, CA) permet la synthèse de fragments d'acides nucléiques fluorescents séparés par une électrophorèse capillaire à l'aide du séquenceur d'ADN "3100 Genetic Analyzer" (Applied Biosystems, Foster City, CA).

2. Souches bactériennes et de levures

2.1. *E. coli DH5α*

E. coli DH5α (*endA1 hsdR17 (rk⁻mk⁺) supE44 thi-1 recA1gyrA (Nal^r) relA1 Δ(lacZYAargF) U169 (∅80dlacΔ (lacZ)M15)*)

Cette souche bactérienne ne contient aucun plasmide, ce qui limite les événements de recombinaison impliquant un plasmide d'intérêt nouvellement intégré. Elle est donc fréquemment utilisée pour amplifier un plasmide recombinant.

2.2. *E. coli BL21-G612*

E. coli BL21-G612 (*F⁻ ompT gal dcm lon hsdSB(r_B⁻ m_B⁻) λ(DE3) pLysS(cm^R)*)

La déficience de cette souche pour deux protéases (ompT et lon) favorise la production des différentes protéines d'intérêt à partir d'un vecteur d'expression. Cette bactérie synthétise également un ARN de transfert possédant le codon arginine. Cet ARNt est très faiblement exprimé chez les procaryotes alors qu'il est très fréquemment retrouvé chez les eucaryotes (triplet AGA).

2.3. *A. tumefaciens LB4404::pMP90*

Abrobacterium tumefaciens est une bactérie Gram négative de la famille des *Rhizobiaceae* utilisée pour transformer des plantes. Cette souche a été fournie par Christophe Ritzenthaler (IBMP, Strasbourg). Il s'agit d'une souche modifiée à partir de la souche *LB4404*

(ClonTech Laboratories Inc.) par l'insertion du plasmide pMP90 qui accroît sa virulence. La souche *LB4404* contient un plasmide Ti désarmé (Tumor inducing), ne contenant plus d'oncogènes. Il porte par contre les gènes de virulence (*vir*) nécessaires au transfert et à l'intégration du T-DNA dans le génome de la cellule végétale. Elle contient dans son génome un gène de résistance à la Rifampicine. Le plasmide d'hypervirulence porte lui un marqueur de résistance à la Gentamicine. Cette souche a été utilisée pour la transformation transitoire de *Nicotiana benthamiana*.

2.4. *S. cerevisiae* AH109

S. cerevisiae AH109 (*MATa*, *trp1-901*, *leu2-3, 112*, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4Δ*, *gal80Δ*, *LYS2* : *GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3*, *MEL1 GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2*, *URA3::MEL1UAS-MEL1TATA-lacZ*)

Cette souche permet de révéler une interaction protéique par la reconstitution d'un facteur de transcription GAL4 fonctionnel. La protéine GAL4 est encodée sur deux plasmides en fusion avec une des deux protéines d'intérêt. La déficience de cette souche pour les gènes TRP1 et LEU2 permet une sélection des co-transformants. L'auxotrophie de cette souche pour les gènes rapporteurs *HIS3*, *ADE2*, *LACZ*, *MEL1* permet de révéler une interaction protéique selon différentes stringences.

3. Vecteurs

3.1. Vecteur de sous-clonage

Le sous clonage de fragments de PCR a été réalisé dans le vecteur pGEM-T en se servant du kit « PGEM-T Easy Vector System » (Promega) (figure II.1A).

Le plasmide pGEM-T a une taille de 3 kb et porte le gène de résistance à l'ampicilline. Il est ouvert et porte à chaque extrémité 3' un T simple brin capable de s'hybrider avec un A simple brin présent à l'extrémité 5' du produit de PCR. Le gène LacZ nécessaire à l' α -complémentation du gène de la β -galactosidase est interrompu par la cassette de clonage, permettant une sélection blanc/bleu des bactéries en présence du substrat de la β -galactosidase (X-gal).

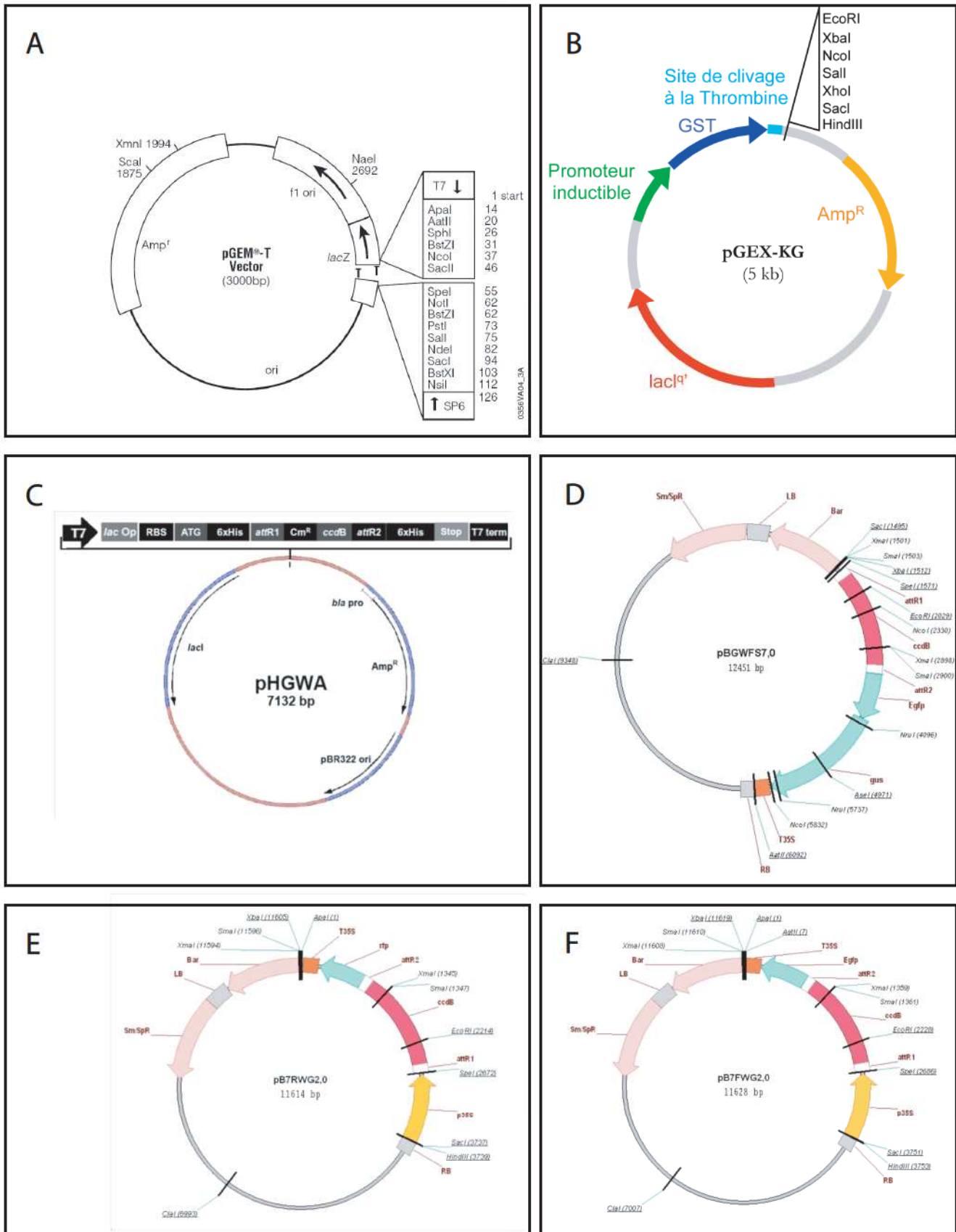


Figure II.1 Représentation schématique des vecteurs de clonage.

A. pGEMTeasy, vecteur de sous-clonage et de production de sondes pour l'hybridation in situ.

B. pGEX-KG, vecteur de surexpression bactérien d'un ADNc fusionné à la GST.

C. pHGWA, vecteur de surexpression bactérien d'un ADNc fusionné à 6 histidine.

D. pBGWFS7, vecteur contenant le gène GUS pour l'étude d'expression de promoteur.

E. pB7FWG2, vecteur gateway d'expression végétal d'une protéine en fusion à la GFP.

F. pB7RWG2, vecteur gateway d'expression végétal d'une protéine en fusion à la RFP.

3.2. Vecteur d'expression chez *E. coli*

Le vecteur pGEX-KG (Pharmacia) est un plasmide de 5 kb possédant un gène de résistance à l'ampicilline afin de sélectionner les bactéries transformées. Une séquence codant la Glutathion S-Transférase (GST) se trouve en amont de la cassette de clonage, afin de produire une fusion GST-Protéine d'intérêt. Un promoteur *tac* permet d'activer l'expression de ce gène, et donc la production de la protéine, par les bactéries *E. coli* BL21-G612 après une induction par l'IPTG. Il est alors possible de purifier la protéine d'intérêt grâce à l'affinité de la partie GST pour le glutathion. Un site de clivage de la thrombine, situé juste après la séquence codant la GST permet finalement de libérer la protéine d'intérêt (figure II.1B).

Le vecteur pHGWA est un plasmide de 7.3 kb possédant un gène de résistance à l'ampicilline afin de sélectionner les bactéries transformées. Une séquence codant pour six histidines se trouve en amont de la cassette de clonage, afin de produire une protéine de fusion 6HIS-Protéine d'intérêt (figure II.1C). Un promoteur *T7* permet d'activer l'expression de ce gène, et donc la production de la protéine, par les bactéries *E. coli* BL21-G612 après induction par l'IPTG. Il est alors possible de purifier la protéine d'intérêt grâce à l'affinité de la partie HIS pour le nickel.

3.3. Vecteur d'étude du promoteur

Le vecteur pBGWFS7 est un vecteur binaire (figure II.1D). Il permet d'étudier l'activité d'un promoteur chez les plantes par l'expression du gène β -glucuronidase (*GUS*). En effet, dans le T-DNA de ce vecteur, le gène *GUS* se trouve en aval des sites attR1 et attR2 et en amont du signal de terminaison du 35S (*T35S*). L'insertion du promoteur d'intérêt se fait par recombinaison homologue (Gateway technology).

3.4. Vecteurs pour l'hybridation *in situ*

Le vecteur utilisé est le pGEMT easy. Les promoteurs SP6 et T7 qu'il contient permettent la transcription du fragment spécifique au gène d'intérêt cloné entre ceux-ci sous la forme d'une sonde ARN sens ou antisens.

3.5. Vecteurs de double hybride

Les vecteurs pGADT7 et pGBKT7 contiennent une cassette de clonage afin de cloner les gènes d'intérêt en phase avec le domaine d'activation AD (pGADT7) ou de liaison à l'ADN BD (pGBKT7) du facteur de transcription GAL4 (figure III.7). Ces constructions sont exprimées sous le contrôle du promoteur ADH1 (PADH1). Un signal d'adressage nucléaire SV40 (SV40NLS ; 1) permet d'adresser les protéines de fusion au noyau de la levure. Un tag HA ou Myc permet une détection des protéines de fusion par western blot. Ces séquences sont entre le domaine AD ou BD et la protéine d'intérêt. Les vecteurs portent les marqueurs de résistance à l'ampicilline ou la kanamycine pour la sélection dans *E. coli*.

3.6. Vecteurs d'expression de protéines en fusion avec un fluorochrome chez *Nicotiana benthamiana*

Les 2 sites de recombinaison spécifique attB1 et attB2 ont été ajoutés par PCR en amont et aval des séquences codantes des protéines. Les amplicons d'ADN ont ensuite été intégrés par recombinaison homologue dans le vecteur d'entrée pDONR221 (Invitrogen) possédant les sites attP1 et attP2 par réaction de BP clonase. Ce vecteur contient un gène de résistance à la kanamycine (Km^R), ainsi qu'un second au chloramphénicol (Cm^R) inséré entre les 2 sites attP. Les enzymes de la BP clonase reconnaissent de manière spécifique les sites attB et attP, ce qui conduit à l'insertion du gène d'intérêt dans le vecteur donneur de façon spécifique et directionnelle (conservation du cadre de lecture). Il se forme alors par cette réaction un vecteur donneur possédant le gène de résistance à la kanamycine (Km^R), les sites de recombinaison homologue AttL1 et AttL2, et le gène d'intérêt. Ce vecteur peut être utilisé pour obtenir différents vecteurs d'expression à partir de vecteurs de destination (pDEST), qui contiennent un gène codant pour un partenaire de fusion (ici GFP ou RFP), un gène de résistance à la spectinomycine (Sp^R) et les sites de recombinaison attR1 et attR2 (figure II.1E et F). Le gène d'intérêt est « transféré » du vecteur d'entrée au vecteur d'expression de manière unidirectionnelle grâce aux enzymes de la LR clonase qui reconnaissent les sites attL et attR de manière spécifique.

4. Amorces utilisées

Hybridation <i>in situ</i>		
Gène	Amorce sens	Amorce antisens
ATF1 At1g03390	5'-CAACCTTAGTTTGTAGCACGTTTG-3'	5'-GATAGAAGCCGAGTAAAGGTATGA-3'
ATA1 At3g42960	5'-AAGGTAGCTATAATAACCGGAGG-3'	5'-AGCTGCTTGAGCTACGTCCTCC-3'

Méthodes de transformation génétique

Clonage gateway

Gène	Amorce sens	Amorce antisens
<i>ACOS5 At1g62940</i>	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGAGAGTCAAAGCAAG-3'	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCCTTCTTGTGATGCTGAGG-3'
<i>CYP704B1 At1g69500</i>	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGTCGTTGTGTTGGTTAT-3'	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTGAACGCTGGATACAGTAA-3'
<i>TKPR1 At4g35420</i>	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGAGAGTCAAAGCAAG-3'	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTGGAAGAACAGTAGATAAA-3'
<i>TPS At4g20420</i>	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGAGAGTCAAAGCAAG-3'	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCCGATTGCCTCCATCTCTG-3'
<i>CYP703A2 At1g01280</i>	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGATTTTGGTGTAGCCTC-3'	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTGTGTACAAATGAGCTGCC-3'
<i>PKSB At4g34850</i>	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGGAAGCATCGATGCTGC-3'	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTGACATCAAGTTTCGAGCG-3'
<i>PKSA At1g02050</i>	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGCAATTTCAAGAGTTTA-3'	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTGGAAGAGGTGAGGCTGCGG-3'
<i>SSL At3g59530</i>	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGAGAAGAAAGGCCAGC-3'	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTGTATTCATTGTCAAAGG-3'
<i>TKPR2 At1g68540</i>	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGCTGAGTATTTGGTAAC-3'	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTGAGCAGACCCCTTCTTGA-3'
<i>ATA1 At3g42960</i>	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCGAACTCAGACAAAAG-3'	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTGTTAGATAAATCTCATA-3'
<i>MS2 At3g11980</i>	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGAGGCTCTCTTCTTGTAGTTC-3'	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTGAGCTCTTCTTCAAGACATG-3'
<i>ATF1 At1g03390</i>	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCTTCTTGCATCCAAGAAC-3'	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTATGATCATTAAAGATAG-3'

Test d'interaction double hybride

Gène	Amorce sens	Amorce antisens
<i>ACOS5 At1g62940</i>	5'-GAGGAATTCATGGAGAGTCAAAGCAAGA-3	5'-CTCGGATCCCTACTTCTTGTGATGCTGAG-3'
<i>CYP704B1 At1g69500</i>	5'-GAGCCCGGTATGTCGTTGTGTTGGTTATA-3	5'-CTCCTGCAGCTATGAACGCTGGATACAG-3'
<i>TKPR1 At4g35420</i>	5'-GAGCATATGATGGATCAAGCAAAGGGAAAA-3'	5'-CTCGGATCCTTATGGAAGAACAGTAGATAAAT-3'
<i>CYP703A2 At1g01280</i>	5'-GAGCATATGATGATTTTGGTGTAGCCTC-3'	5'-CTCGAATCTTATGTGTACAAATGAGCTGC-3'
<i>PKSB At4g34850</i>	5'-GAGCATATGATGGGAAGCATCGATGCTG-3'	5'-CTCGAATCTCAGACATCAAGTTTCGAG-3'
<i>PKSA At1g02050</i>	5'-GAGCATATGATGTCGAATTCTAGGATGAAT-3'	5'-CTCGGATCCTTAGGAAGAGGTGAGGCTG-3'
<i>TKPR2 At1g68540</i>	5'-GAGGAATTCATGCTGAGTATTTGGTAAC-3'	5'-CTCCCGGTTAGAGCAGACCCCTTCTTCT-3'

II. Méthodes de transformation génétique

1. Transformations bactériennes

La souche d'*E. coli DH5α* a été préparée soit pour l'électroporation soit pour la transformation par choc thermique. Les souches d'*E. coli BL21-G612* et *A. tumefaciens* sont exclusivement électrotransformées.

1.1. Transformation par choc thermique

Préparation des bactéries

Afin de pouvoir intégrer un plasmide, les bactéries utilisées doivent être préalablement rendues compétentes. Le traitement consiste à perméabiliser les membranes bactériennes grâce à une combinaison de DMSO (DiMéthyle SulfOxide) et de calcium. Des colonies fraîches de bactéries sont mises en culture sous agitation vigoureuse à température ambiante dans 200 mL de milieu SOB. Lorsque la culture atteint 0,45 (pour l'absorbance $A_{600 \text{ nm}}$), la prolifération des cellules est stoppée en plaçant les bactéries dans la glace (10 min). La culture

Méthodes de transformation génétique

est ensuite centrifugée (2 500 g, 15 min) à température ambiante et le culot est lavé à deux reprises dans 64 mL de tampon HTB froid (4 °C). Le culot de cellules est repris dans 16 mL de tampon HTB auquel sont ajoutés 1,2 mL de DMSO. Les bactéries compétentes sont alors aliquotées, congelées dans l'azote liquide et conservées à - 80 °C jusqu'à utilisation.

Milieu SOB	Bacto-tryptone 20 g/L ; Bacto-yeast extract 5 g/L ; NaCl 0,5 g/L, KCl 250 mM ; ajusté à pH 7 avec du NaOH ; additionné après autoclavage de MgCl ₂ 10 mM et MgSO ₄ 10mM.
Tampon HTB	Tampon Hépès 10 mM ; CaCl ₂ 15 mM ; KCl 250 mM ; H ₂ O, ajusté à pH 6,7 avec du KOH ; MnCl ₂ 55 mM ; stérilisé par filtration sur membrane Millipore 0,22 µm

Choc thermique

Le mélange de ligation (10 µl) est ajouté aux bactéries compétentes *DH5α*. Le mélange est laissé 5 min sur glace puis transféré pendant 1 min au bain-marie à 42°C. Après le choc thermique, les bactéries sont incubées 1 h à 37°C dans 500 µl de milieu LB, étalées sur milieu sélectif et incubées une nuit à 37°C.

1.2. Transformation par électroporation

Préparation des bactéries

Les bactéries sont cultivées dans 10 mL de LB sur une nuit. Un mL de cette préculture permet d'inoculer 1 L de LB frais. La culture se fait à 37 °C sous agitation jusqu'à l'obtention d'une A_{600 nm} de 0,5 à 0,8. Les bactéries sont placées 30 min sur la glace puis centrifugées 15 min à froid à 4000 g. Le culot est lavé deux fois dans 500 mL d'eau stérile froide et centrifugé à nouveau 15 min. Les bactéries sont remises en suspension dans 20 mL de glycérol 10 %, centrifugées 10 min et finalement reprises dans 3 mL de glycérol 10 % avant d'être aliquotées, plongées dans l'azote liquide et conservées à - 80 °C.

Electroporation

Le mélange de ligation (2 µl) est ajouté aux bactéries compétentes. Le mélange est laissé quelques minutes sur glace puis transféré dans une cuve d'électroporation. Le contrôleur d'impulsion est réglé sur 25 µF de capacité et 2,5 kV/cm, et la résistance à 200 Ω pour *E. coli* ou 400 Ω pour *A. tumefaciens*. Après le choc électrique, les bactéries transformées sont incubées 1 h à 37°C dans 500 µL de milieu LB, étalées sur milieu sélectif et

incubées une nuit à 37°C pour *E. coli* ou 28°C pour *A. tumefaciens*.

2. Transformation stable d'*Arabidopsis*

Un clone isolé d'*Agrobacterium tumefaciens*, contenant la construction désirée est mis en culture dans du milieu LB à 28°C pendant une nuit. Les bactéries sont centrifugées à 2500g pendant 15 min puis reprises dans la solution d'infiltration (1/2 MS221, saccharose 5%, silvet L-77 0.05%, acétosyringone 200 µM). Des plantes adultes possédant plusieurs hampes florales avec des boutons floraux présentant l'ensemble des stades de développement de la fleur, sont transformées par "floral dip" (Clough and Bent, 1998). Les hampes florales sont plongées dans la suspension bactérienne pendant 1 min. Après égouttage, les plantes sont placées en maxi-serre à l'obscurité pendant 48 h, puis un taux d'humidité et une photopériode normaux sont rétablis progressivement jusqu'à récolte des graines. Selon le vecteur de transformation utilisé, les graines sont semées sur un milieu de sélection contenant l'agent de sélection approprié (de la céfotaxime est ajoutée pour tuer les agrobactéries) ou semées en terre où les jeunes plantules subiront un traitement Basta.

3. Transformation de levures

La méthode de transformation des levures par l'acétate de lithium consiste à « décaper » leur membrane puis à leur faire subir un choc thermique.

Préparation des cellules compétentes

10 ml de milieu YPglu sontensemencés avec la souche de levure AH109 à transformer et incubés à 30°C avec agitation pendant la nuit. La culture est ensuite diluée au 1/50 dans 50 ml de milieu YPglu. La solution est cultivée à 30°C sous agitation jusqu'à une densité cellulaire de 1. Il faut 10 ml de cette culture pour une transformation. La culture est centrifugée 5 min à 5 000 g dans des tubes Falcon. Le culot est resuspendu délicatement avec 2 ml d'eau stérile puis recentrifugé. Le lavage est effectué trois fois à l'eau stérile puis 3 fois avec une solution TE/LiAc stérile. Le culot est repris dans 200 µl TE/LiAc stérile et ajusté à 250 µl avant répartition dans 5 tubes 1.5 ml.

Choc thermique

10 µl d'ADN entraîneur de sperme de hareng (dénaturé préalablement 5 min à 95°C), 300 ng de chaque plasmide et 350 µl de TE/LiAc/PEG (préparé extemporanément) sont

ajoutés aux tubes avant agitation par aspiration/refoulement au pipetman. Le mélange est incubé à 30°C pendant 30 min sans agiter puis un choc thermique est effectué en plaçant les tubes 20 min à 42°C. Les cellules sont alors étalées sur milieu sélectif (privé de Leucine et de Tryptophane) et incubées à 30°C pendant 48 à 72 h.

SOLUTIONS

Solutions mères :

- Solution TE 10 X :

Tris-HCl (pH 7,5)	100 mM	pour 500 ml	50 ml de 1 M
EDTA	10 mM		10 ml de 0,5 M
	----> autoclaver		

- Solution LiAc 10 X :

Acétate de Lithium pH 7,5	1 M
	----> autoclaver

- Solution PEG 3350 (filtrer la solution mère, diluer extemporanément) :

Polyéthylène glycol 3350 (p/vol)	50%
----------------------------------	-----

Solutions finales à préparer stérilement à partir des solutions mères :

- Solution TE/LiAc :

Solution TE 10 X	10 ml
Solution LiAc 10 X	10 ml
H ₂ O	qsp 100 ml

- Solution TE/LiAc/PEG :

Solution TE 10 X	0,1 ml	
Solution LiAc 10 X	0,1 ml	
Solution PEG 3350 (p/vol) 50%	0,8 ml	(40% final)

- ADN entraîneur à 5 mg/ml (ADN de sperme de hareng soniqué et dénaturé)

4. Transformation de *Nicotiana benthamiana* par agroinfiltration

L'agroinfiltration consiste en l'introduction à l'aide d'une seringue d'une culture d'*Agrobacterium* dans les feuilles de *Nicotiana benthamiana* âgées de 4 semaines et aboutissant à l'expression transitoire d'un ou plusieurs gènes d'intérêt.

Pour cela, un clone isolé d'*Agrobacterium tumefaciens* (LB4404::pMP90), transformé avec l'une des constructions désirées sous le contrôle du promoteur 35S, est mis en culture dans du milieu LB à 28°C pendant une nuit en présence des antibiotiques de sélection. Une culture fraîche est relancée jusqu'à obtenir une A_{600 nm} de 0.5. Les bactéries sont centrifugées à 2500g pendant 15 min puis reprises dans de l'eau et lavées 3 fois. Le culot est alors resuspendu dans l'eau pour obtenir une A_{600 nm} de 0,3. Quand plusieurs clones d'*Agrobacterium tumefaciens* sont utilisés pour co-transformer une feuille, les cultures sont mélangées volume à volume. Afin d'optimiser l'expression des protéines d'intérêt, les feuilles

ont été co-transformées avec une souche permettant l'expression de la protéine P19 (suppresseur de silencing du *Tomato Bushy Stunt Virus*). Après infiltration, les plantes sont placées en serre pendant 3-5 jours en fonction de la construction puis analysées.

III. Matériel végétal et conditions de culture

L'ensemble des expériences a été réalisé sur des plantes d'*Arabidopsis thaliana* d'écotype Columbia-0 (Col-0), des plantes de *Brassica napus* variété *westar* (*double 0*) et des plantes *Nicotiana benthamiana*.

1. *Arabidopsis thaliana*

Les mutants d'insertion T-DNA ont été obtenus des collections de l'institut SALK (noté SALK, <http://www.salk.edu/>), GABI-KAT (noté GK, <http://www.gabi-kat.de/>), et SAIL (noté SAIL, <http://www.salk.edu/>). Avant germination, les graines ont été stérilisées en surface puis placées sur un milieu Murashige and Skoog (Duchefa) solidifié avec 0,8 % d'agar. Après deux jours de vernalisation à 4°C à l'obscurité, pour permettre une germination homogène, les semis ont été placés à 21°C sous une intensité lumineuse de 70 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ avec une photopériode de 12 h. Après 12 jours, les plantes repiquées en terre ont été transférées en chambre de culture où les conditions sont contrôlées: intensité lumineuse de 70 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, photopériode de 16 h, 28°C. Quatre semaines après la germination, les plantes sont transférées en serre sous une photopériode de 16 h pour induire la floraison. Les mutants T-DNA utilisés sont les suivants :

Mutant	Gène touché	Lignée
<i>acos5</i>	At1g62940	JICSM_337225
<i>cyp704</i>	At1g69500	SAIL_1149_B03
<i>tkpr1</i>	At4g35420	SAIL_837_D01
<i>tps</i>	At4g20420	SALK_031864
<i>cyp703</i>	At1g01280	SALK_119582
<i>pks-b</i>	At4g34850	GK-089C04.01
<i>pks-a</i>	At1g02050	SALK_134643C
<i>ssl/lap3</i>	At3g59530	SALK_033871
<i>ms2</i>	At3g11980	NASC ID: N1632
<i>tkpr2</i>	At1g68540	SALK_129453C
<i>ata1</i>	At3g42960	SAIL_423_H04
<i>pks-c -1</i>	At4g00040	GT_5_83040
<i>pks-c -2</i>	At4g00040	SAIL_829_D04

<i>acos5</i>	At1g62940	SM_3.37225
<i>atf1</i>	At1g03390	GK-223H01
<i>tkpr1-2</i>	At4g35420	SAIL_019_D01

Pour certains gènes un deuxième allèle a été caractérisé et sont décrits dans les publications (Grienenberger et al., 2010; Kim et al., 2010).

2. *Brassica napus*

Les graines ont été obtenues des collections de l'INRA de Versailles. Pour la germination, les graines ont été disposées en surface d'un papier filtre humidifié avec de l'eau osmosée puis placées en chambre de culture in vitro pendant 48-72 h, jusqu'à apercevoir une radicule et un hypocotyle bien formés. Les boîtes sont alors transférées au froid et à l'obscurité pour vernalisation pendant 8-10 jours. Après vernalisation, les plantules sont repiquées en serre dans des pots de 2 litres contenant du terreau, à raison de 2-3 plantes par pot. Les plantes surnuméraires sont éliminées environ 10 jours après le repiquage pour n'avoir qu'une seule plante vigoureuse par pot. La floraison aura lieu environ 5-8 semaines après repiquage en serre.

Pour permettre une germination homogène, les semis ont été placés à 21°C sous une intensité lumineuse de 70 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ avec une photopériode de 12 h. Après 12 jours, les plantes repiquées en terre ont été transférées en chambre de culture où les conditions sont contrôlées: intensité lumineuse de 70 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, photopériode de 16 h, 28°C. Quatre semaines après la germination, les plantes sont transférées en serre sous une photopériode de 16 h pour induire la floraison.

3. *Nicotiana benthamiana*

Les plantes ont été cultivées en serre sous une intensité lumineuse de 40 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ avec une photopériode de 16h jour/8h nuit à 19-23°C pendant 4 semaines avant transformation.

IV. Analyse et caractérisation de lignées d'insertion T-DNA

La caractérisation des mutants T-DNA consiste à rechercher des plantes possédant un insert TDNA et à confirmer l'interruption du gène d'intérêt. Pour cela, les graines fournies par les banques de mutants, sont mises à germer *in vitro* sur milieu contenant l'antibiotique correspondant au marqueur de sélection porté par le T-DNA. Une ségrégation de la résistance et donc du T-DNA peut parfois être obtenue. Les plantules résistantes sont ensuite génotypées pour confirmer le site d'insertion du T-DNA et identifier des individus homozygotes pour l'insertion. Pour cela, l'ADN génomique (ADNg) de ces plantes est extrait et le site d'insertion du T-DNA est localisé par PCR et séquençage.

1. Extraction d'ADN génomique rapide

Cette méthode permet d'extraire rapidement de l'ADNg d'un grand nombre d'échantillons, à partir de peu de matériel biologique. La qualité de l'ADNg obtenue est suffisante pour réaliser les PCR. Une jeune feuille d'*Arabidopsis* (de environ 5 mg) est broyée dans 400 µl de tampon d'extraction (Tris-HCl pH 7.5 200 mM, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM, SDS 0,5%). Après centrifugation (12000g, 5 min), 300 µl du surnageant sont prélevés et l'ADN précipité par 300 µl d'isopropanol pendant 5 min à température ambiante. Après centrifugation (12000g, 10 min), le culot d'ADN est repris dans 100 µl de Tris-HCl pH 8.5 (10 mM). 0,8 µl de cet ADN est utilisé comme matrice pour le génotypage par PCR.

2. Génotypage par PCR

Le génotypage des populations de mutants nécessite une analyse par PCR. Pour chaque lignée, 2 combinaisons d'amorces différentes sont utilisées :

- Une amorce sens et une amorce antisens s'hybrident spécifiquement sur le gène d'intérêt, de part et d'autre de la zone prédite de l'insertion du T-DNA. La présence d'un amplicon met en évidence un allèle sauvage sans insertion T-DNA.
- Une amorce sens s'hybrident spécifiquement avec le gène d'intérêt et une amorce antisens s'hybrident spécifiquement sur le T-DNA (ou inversement). Cette combinaison doit permettre d'amplifier un fragment hybride gène d'intérêt/T-DNA, c'est-à-dire l'allèle interrompu par le T-DNA. Par la suite, le séquençage de ce produit PCR permet de localiser précisément la

zone d'insertion du T-DNA dans le gène.

Amorces utilisées :

	Amorce sens	Amorce antisens	Amorce T-DNA
At1g62940	5'-GTGCCCATTCCTGACAAACT-3'	5'-TTGGCTATGAGATTGCGATG-3'	5'-ACCCGACCGGATCGTATCGGT-3'
At1g69500	5'-TCTGAGGCATTGCTTGATAA-3'	5'-CATATGTGACCATCCCTCCA-3'	5'-GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCTTCC-3'
At4g35420	5'-GATGCCAAGGAGTGTCCAT-3'	5'-TGGACCCAAAAACGAGTCAT-3'	5'-GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCTTCC-3'
At4g20420	5'-AGCATGTTCTGGTTCATCTTCA-3'	5'-AGAGGAAAGATTCCACAGTCAT-3'	5'-ATTTTGCCGATTTTCGGAAC-3'
At1g01280	5'-TTTACCTCATCGGGACTTGG-3'	5'-CTTCCCGTTCTCACCAGGTA-3'	5'-ATTTTGCCGATTTTCGGAAC-3'
At4g34850	5'-GGCGCAGAAAACAGAGAAGAC-3'	5'-AACCCGTTATGAGAAGATCCAA-3'	5'-ATATTGACCATCATACTCATTGC-3'
At1g02050	5'-GCATCCACCATCTTTCTTCC-3'	5'-GGGGTTGTTCTCAGCAATGT-3'	5'-ATTTTGCCGATTTTCGGAAC-3'
At3g59530	5'-AGCACGAGAAGCTGTGTGG-3'	5'-CTTGTGCCGGTGTCTGC-3'	5'-ATTTTGCCGATTTTCGGAAC-3'
At1g68540	5'-GTGCCAAGTCTAAAGCCACA-3'	5'-TGAAGGATCCAAATCCCAAC-3'	5'-ATTTTGCCGATTTTCGGAAC-3'
At3g42960	5'-TGGCGAACTCAGACAAAAGA-3'	5'-TCAGCGACGTTGAGTTTGTG-3'	5'-GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCTTCC-3'
At4g00040	5'-GTTCCCAACCATCAAACAG-3'	5'-TGTGTTAGCATCGGTTCTCG-3'	5'-ATTTTGCCGATTTTCGGAAC-3'
At1g03390	5'-AATGGCTTCTTGCATCCAAGA-3'	5'-TTATTTATGATCATTAAAGAT-3'	5'-ATTTTGCCGATTTTCGGAAC-3'

3. Vérification de la perte d'expression des gènes d'intérêt

3.1. Extraction d'ARN totaux

Les ARN totaux sont extraits à partir de 50 mg de bourgeons floraux conservés à -80°C avant broyage dans l'azote liquide. Cette extraction est réalisée par 1 ml de TRIzol Reagent (Invitrogen) conformément aux recommandations du fabricant.

3.2. RT-PCR qualitative

La synthèse d'ADNc est effectuée par la SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) à partir de 1 µg d'ARN total et d'amorce oligo(dT). Pour cela, une solution initiale de 13 µl contenant 50 µM d'oligo(dT)₂₀, 1 µl de dNTP à 10 mM ainsi que 1 µg d'ARN est incubée 5 min à 65°C puis mise dans la glace. Sont alors ajoutés 5 mM de DTT, le tampon réactionnel 5 x de l'enzyme, 4 U de RNaseOUT, 2 U de transcriptase inverse SuperScript III pour un volume final de 20 µl. Le milieu réactionnel est alors incubé 5 min à 25°C puis 1 h à 50°C. L'enzyme est enfin inactivée 15 min à 70°C.

Par la suite le niveau d'expression de chaque gène d'intérêt est comparé à celui de la plante sauvage. Des amorces spécifiques ont été dessinées pour chacun des gènes d'intérêt :

Gène	Amorce sens	Amorce antisens
<i>TKPR2 At1g68540</i>	5'-GTGCCAAGTCTAAAGCCACA-3'	5'-TGAAGGATCCAAATCCCAAC-3'
<i>TKPRI At4g35420</i>	5'-GATGCCAAGGAGTGTCCAT-3'	5'-TGGACCCAAAAACGAGTCAT-3'
<i>PKSB At4g34850</i>	5'-GGCGCAGAAAACAGAGAAGAC-3'	5'-AACCCGTTATGAGAAGATCCAA-3'
<i>PKSA At1g02050</i>	5'-GCATCCACCATCTTTCTTCC-3'	5'-GGGGTTGTTCTCAGCAATGT-3'
<i>ACOS5 At1g62940</i>	5'-GTGCCAAGTCTAAAGCCACA-3'	5'-TGAAGGATCCAAATCCCAAC-3'
<i>SSL At3g59530</i>	5'-AGCACGAGAAGCTGTGTGG-3'	5'-CTTGTGCCGGTGTCTGC-3'
<i>TPS At4g20420</i>	5'-AGCATGTTCTGGTTCATCTTCA-3'	5'-AGAGGAAAGATTCCACAGTCATT-3'
<i>CYP704B1 At1g69500</i>	5'-TCTGAGGCATTGCTTGATAA-3'	5'-CATATGTGACCATCCCTCCA-3'
<i>CYP703A2 At1g01280</i>	5'-TTTACCTCATCGGGACTTGG-3'	5'-CTTCCCGTTCTCACCAGGTA-3'
<i>ATA1 At3g42960</i>	5'-TGGCGAACTCAGACAAAAGA-3'	5'-TCAGCGACGTTGAGTTTGTG-3'
<i>ATF1 At1g03390</i>	5'-AATGGCTTCTTGCATCCAAGA-3'	5'-TTATTTATGATCATTAAAGAT-3'

Extraction et analyses métaboliques

MS2 At3g11980

5'-TAATGGAGGCTCTCTTCTTGAG-3'

5'-TTAAGCTCTTCCTTTCAAGA-3'

Afin de pouvoir apprécier les quantités relatives des ARNs dans les différents échantillons, l'expression de la β -tubuline, un gène constitutif, est évaluée à l'aide des amorces :

sens : 5'-CGTGGATCACAGCAATACAGAGCC-3'

antisens : 5'-CCTCCTGCACTTCCACTTCGTCTTC-3'

La réaction de PCR est réalisée à l'aide d'un thermocycleur (Biorad) dans un milieu réactionnel de 25 μ l : Amorce sens (0,4 μ M) ; amorce antisens (0,4 μ M) ; tampon réactionnel 5x (Tris-HCl pH 8,4 32 mM, KCl 80 mM) ; MgCl₂ (0,64 mM) ; dNTP (0,16 μ M) ; Taq DNA polymérase (Invitrogen) 0,5 U ; matrice ADNc 0,8 μ l ; H₂O 11,1 μ l.

Le programme utilisé débute par une dénaturation de 2 min à 95°C. Ensuite 35 cycles sont réalisés comprenant : une dénaturation de 30 s à 95°C, une hybridation de 30 s à 57°C et une élongation de 1 min à 72°C. Les produits d'amplification sont séparés sur gel d'agarose 1,5 % dans du TAE 0,5 x. L'ADN est révélé au bromure d'éthidium (BET), puis visualisé sous UV.

V. Extraction et analyses métaboliques

1. Extraction de polykétides

100 étamines au même stade de développement sont prélevées, pesées et rapidement congelées dans de l'azote liquide puis conservées à -80°C jusqu'à leur utilisation. Pour l'extraction des métabolites solubles, les tissus sont broyés finement dans un tube eppendorf avec des billes de verre avec un broyeur *Vivadent* quand les tissus sont encore congelés (12 s). Pour l'extraction des polykétides un mélange méthanol/eau (4/1 ; v/v) est alors ajouté au broyat (150 μ l / mg de poids frais d'étamines), qui est broyé une seconde fois. L'ensemble est centrifugé 10 min à 13000 g et à 4°C. Le surnageant est prélevé puis conservé à -20°C jusqu'à son analyse.

2. Extraction d'esters de CoA d'acides gras solubles et d'acides gras

L'extraction des esters de CoA est obtenue selon le même procédé avec 100 μ l de tampon Phosphate 50 mM à pH 7. 5,7 μ l de soude à 0,4 M sont ajoutés à la solution pour

obtenir un pH de 9 permettant d'hydrolyser les esters de CoA et d'obtenir les acides gras sous forme libre.

3. Analyse et caractérisation de métabolites lipidiques par chromatographie liquide-spectrométrie de masse (LC-MS/MS)

Le matériel et les conditions d'analyse en HPLC et LC-MS/MS des métabolites sont décrits dans la publication (Grienenberger et al., 2010). Un système UPLC couplé à un spectromètre de masse de type ESI-triple quadrupole (quattro premier XE, Waters) a été utilisé. Les composés lipophiles ont été séparés par un système UPLC (BEH, Waters) sur une colonne de phase réverse (Novapak RP C18 ; 2,1 x 100 mm, 1.7 µm; Waters) et une précolonne (2.1x5 mm, 1.7 µm) à 25°C et pour un débit de 0,45 ml/min. Des échantillons de 3 µl ont été injectés et élués par un gradient croissant d'acétonitrile/eau contenant 0,1% d'acide formique. Les conditions du gradient sont les suivantes : 3-20 % d'acétonitrile en 15 min, 20-40 % d'acétonitrile en 10 min, 100% d'acétonitrile pendant 3 min pour laver la colonne puis 3 % pendant 5 min pour rééquilibrer la colonne.

Analyses des polykétides

solvant A : H₂O+ 0.1% acide formique

solvant B : Acétonitrile + 0.1% acide formique

Temps	flux (ml/min)	%A
0	0.45	90
1	0.45	90
25	0.45	0
27	0.45	0
28	0.45	90
32	0.45	90

Température de colonne 25°C

L'analyse par spectrométrie de masse a été réalisée grâce à un système d'ionisation par électrospray (ESI-) et a consisté à enregistrer la présence de toutes les molécules de masses comprises entre 100 et 900 Da grâce au détecteur quadrupole. L'azote a été utilisé comme gaz de nébulisation et de désolvation. L'ionisation des composés a été réalisée pour une tension de cône de 25 V en mode positif et négatif. Les données de masse ont été collectées au moyen du logiciel Mass-lynx. Le même matériel a été utilisé pour la recherche de substrats dans les extraits d'étamines. Le gradient utilisé pour analyser les acides gras est décrit ci-dessous.

Analyses du pollen

Analyse d'Acides Gras

solvant A : H₂O/MeOH (50/50) + 0.1% acide formique

solvant B : Isopropanol + 0.1% acide formique

Temps	flux (ml/min)	%A
0	0.3	75
1	0.3	75
8	0.27	0
14	0.27	0
18	0.3	75
19	0.3	75

Température de colonne 46°C

VI. Analyses du pollen

1. Préparation de pollen

Une vingtaine d'inflorescences d'*Arabidopsis* avec un maximum de fleurs ouvertes sont récoltées dans un tube de 50 ml. 40 ml de PBS 1X ou de mannitol 0,3 M sont ajoutés, puis le tube est vortexé vigoureusement pour libérer les grains de pollen des fleurs. L'ensemble est ensuite filtré avec une toile à bluter de 50 µm. Le filtrat est récupéré dans un nouveau tube, puis centrifugé à 1500 g pendant 5 min. Le surnageant est enlevé délicatement avec une pipette pour ne pas resuspendre le culot constitué des grains de pollen. Environ 1 ml de surnageant est laissé au fond du tube, avec lequel le culot est repris. L'ensemble est transféré dans un tube eppendorf, une nouvelle centrifugation à 1500 g permet de culoter les grains de pollen. Le pollen ainsi concentré peut servir pour des analyses ultérieures.

2. Coloration à l'Auramine-O

Le pollen est incubé 5 min dans une solution d'Auramine O à 0,01% dans l'eau. L'ensemble est centrifugé 1 min à 1000 g puis le surnageant est éliminé. Le culot de pollen est lavé deux fois en répétant l'opération puis est repris dans environ 50 µl. 10 µl sont déposés sur lame et recouverts d'une lamelle, puis observés au microscope à épifluorescence en utilisant le filtre FITR (λ_{max} émission = 460-500 nm).

3. Microscopie électronique à transmission

Les grains de pollen sont fixés dans une solution de glutaraldéhyde 3% dans un tampon phosphate 150 mM pH 7,4, pendant 2 h à température ambiante, puis la nuit à 4°C. Le pollen est concentré par une centrifugation de 10 sec à 1000 g et un maximum de tampon est prélevé. 100 µl de gélose « low melting » en surfusion ajoutés sur le culot puis homogénéisés. Après polymérisation, la gélose est découpée en cubes de 3 mm³ et mise dans un nouveau tube. Les cubes sont lavés deux fois dans de l'eau bidistillée 15 min à température ambiante puis post-fixés dans une solution à 1% de tétraoxyde d'osmium (OsO₄) 2 h à 4°C. Les cubes sont lavés 3 fois 15 min dans de l'eau bidistillée puis post-fixés dans une solution d'acétate d'uranyle 2 % la nuit à 4°C. Après trois lavages de 15 min dans l'eau, les échantillons sont déshydratés par des bains successifs d'éthanol à 50%, 70% et 90% de 20 min chacun puis trois bains de 1 h dans de l'éthanol 100% à température ambiante. L'inclusion des échantillons commence par le bain des cubes pendant 20 min dans de l'oxyde de propylène 100%, puis dans un mélange oxyde de propylène/EPON (v/v) et finalement 2 heures dans de l'EPON 100%. La polymérisation de l'EPON est effectuée à 60°C pendant 72 h. Des coupes ultrafines sont réalisées avec un microtome à diamant (Reichert Ultracut E) et observées avec un microscope électronique à transmission (Hitachi H7600).

4. Microscopie électronique à balayage

La microscopie électronique à balayage à été réalisée avec un appareil Philips XL30 ESEM (FEI, Eindhoven, Pays-Bas), équipé avec un détecteur d'électrons secondaires Everhart-Thornley et un filament LaB₆, et combiné avec un système de microanalyse PGT 'Spirit' EDX (Princeton Gamma-Tech, Princeton, NJ, USA). Les grains de pollen ont été déposés directement sur un adhésif en carbone en tapotant une fleur ouverte, puis métallisés à l'or (Sputter Coater S150A; Edwards High Vacuum, Crawley, Royaume-Uni) 3 min à 50mV. Les observations ont été réalisées en mode « vide poussé » (5,4 Torr) à 20 kV.

5. Germination du pollen *in vitro*

Les tests de germination *in vitro* du pollen ont été faits selon le protocole décrit dans (Boavida and McCormick, 2007). Le milieu de germination est composé de 0,01% d'acide

borique, 5 mM de CaCl₂, 5 mM de KCl, 1 mM de MgSO₄, 10 % de saccharose et 1,5 % d'agarose *low melting*. Le pH est ajusté à 7,5. Le milieu est coulé sur des lames de microscope, puis le pollen est déposé en tapotant des fleurs ouvertes au-dessus des lames. Celles-ci sont placées dans une boîte fermée avec un papier humide, puis placées à l'obscurité, à une température de 22°C. La germination du pollen est observée au microscope, après 2 à 16 h de germination.

6. Germination *in vivo* du pollen, coloration du pistil à l'Aniline

Les sépales, pétales et étamines sont enlevés de fleurs dont les pétales commencent à apparaître. Les pistils sont laissés 24 h en serre pour qu'ils s'allongent, puis sont pollinisés manuellement en secouant une fleur au-dessus. Entre 0 et 24 h post-pollinisation, les pistils sont prélevés puis coupés longitudinalement en deux parties identiques. Celles-ci sont fixées dans une solution éthanol/acide acétique (3/1 ; v/v) pendant 1 h à température ambiante, puis incubées dans une solution NaOH 8 M pendant la nuit. Les pistils sont lavés plusieurs fois dans de l'eau distillée puis incubés dans une solution d'aniline 0,1% dissout dans 0,1 M K₂HPO₄, pendant 3 h, dans l'obscurité. Le pistil coloré est monté entre lame et lamelle dans une goutte de glycérol, puis observé sous lumière UV ("max émission = 330 nm) avec un microscope à épifluorescence.

7. Coloration d'Alexander

Plusieurs étamines sont prélevées avec une pince, et déposées sur une lame de microscope puis immergées dans une goutte de la solution d'Alexander (Alexander, 1969) et couvertes d'une lamelle. Après 5 min, la lame est observée au microscope.

VII. Histologie

1. Coloration GUS

Les conditions d'incubation des tissus pour la coloration β -glucuronidase (GUS) ainsi que l'inclusion des tissus, la réalisation et l'analyse des coupes sont décrites dans la

publication (Grienenberger et al., 2009).

2. Immunocytochimie

Microscopie optique

Préparation des tissus : Des bourgeons floraux d'*Arabidopsis* sont prélevés puis fixés dans une solution aqueuse FAA (Formaldéhyde 3,7% ; Ethanol 50% ; Acide acétique 5%). Les échantillons sont ensuite déshydratés dans une série de bains d'éthanol à 50%, 70% et 90%, puis inclus dans du paraplast avant d'effectuer des coupes de 10 µm d'épaisseur avec un microtome Leica RM2155.

Immunolocalisation : Les coupes sont déposées sur lame, séchées puis déparaffinées dans de l'Histo-clear (National diagnostics) avant de réhydrater les échantillons dans une solution de PBS, puis bloquées pendant 1 h dans une solution PBS contenant de la BSA 1%, du Triton 0,05% et du sérum de chèvre 5%. L'anticorps primaire de lapin est dilué au 1/200^{ème} dans le tampon de blocage et laissé au contact des coupes la nuit à 4°C. Les lames sont lavées 3 fois dans du PBS, 1% BSA, 0,05% Triton, puis l'anticorps secondaire (chèvre anti-lapin couplé à la phosphatase alcaline), dilué au 1000^{ème} dans du PBS est ajouté sur les lames. Après une incubation de 1 h à température ambiante, les lames sont lavées 4 fois dans du PBS, le pH ajusté à 8,1 dans un tampon Tris-HCl 100 mM et les signaux sont révélés avec le réactif FastRed (Roche). Les lames sont montées dans du PBS/Glycérol (1/1 ; v/v) puis observées au microscope.

Microscopie électronique

Préparation des tissus : Pour obtenir des coupes de cellules du tapétum, des étamines ont été fixées avec du paraformaldéhyde et une post-fixation a été réalisée avec du tétraoxyde d'osmium. Les échantillons fixés ont été colorés à l'acétate d'uranyle et déshydratés dans des bains d'éthanol de concentrations croissantes (0-100%) puis progressivement inclus dans de la résine LRwhite. Les échantillons ont été placés à 60°C pendant au moins 48 h pour polymérisation. Des sections ultrafines (70 nm) ont été réalisées à l'aide d'un couteau en diamant fixé à un microtome (Reichert-Jung Ultracut E) et placés sur des grilles de nickel.

Immunolocalisation : Avant utilisation, les anticorps ont été épuisés au moyen de poudre acétonique de feuilles d'*Arabidopsis* pour éliminer un maximum de bruit de fond. La spécificité des anticorps a été augmentée en pré-incubant le serum dirigé contre l'une des protéines PKS avec l'autre PKS recombinante. La spécificité a alors été démontrée par

western blot et aucune réaction croisée n'a pu être observée (Grienenberger et al., 2010). Pour l'expérience d'immunolocalisation, les coupes ont été incubées pendant 30 min dans une solution de PBS contenant 1% BSA afin de bloquer les sites aspécifiques. Elles ont ensuite été incubées en présence des anticorps à des dilutions de 1/200 à 1/500 dans la solution de blocage pendant 2 h à température ambiante. Après trois lavages au PBS, les coupes ont été incubées avec du serum dirigé contre les anticorps de lapin et couplé à des billes d'or de 15 nm de diamètre (Aurion, The Netherlands). Ce serum a été dilué à 1/50 dans une solution de PBS avec 0,1% de BSA. Les échantillons ont été lavés trois fois dans du PBS, séchés puis observés avec un microscope Hitachi H-600 équipé d'une camera Orca HR Hamamatsu.

3. Fractionnement subcellulaire d'extraits d'étamines de *Brassica napus*

Le fractionnement subcellulaire consiste en la séparation des différents compartiments cellulaires. Des bourgeons floraux de 2-3 mm ont été disséqués pour récupérer 3 g d'anthères fraîches (environ 120 bourgeons). Les anthères sont alors découpées en lamelles à la lame de rasoir dans un tampon de 50 mM Tris-HCl pH 7,5 contenant du saccharose à 0,6 M, 1 mM EDTA, 1 mM MgCl₂ et 1 mM DTT. Les extraits sont centrifugés à basse vitesse (10000g) pendant 30 min pour culoter les débris végétaux. Pour la préparation de fraction membranaires (dont le RE) et cytosoliques, deux procédures ont été utilisées.

La première procédure utilisée correspond à celle décrite dans (Hsieh and Huang, 2007) où le surnageant est coulé sur un gradient discontinu formé de 3 phases (1 M, 0,8 M et 0,6 M de saccharose). Le système est alors centrifugé dans un rotor SW50.1 à 35000 g pendant 4 h. Les membranes sont retrouvées à l'interface des phases 0,8 M et 1 M alors que les protéines cytosolubles restent dans la fraction 0,6 M.

La seconde procédure a consisté à culoter la fraction membranaire en centrifugeant l'extrait végétal à 100000 g pendant 1 h. Le contrôle de la qualité et des contaminations entre les différents compartiments a été effectué en recherchant la protéine marqueur Calréticuline (endémique du réticulum) lors de western blot et par des analyses en microscopie électronique.

VIII. Production de protéines recombinantes

1. Obtention de la séquence codante et clonage dans le vecteur d'expression

Une transcription reverse a été effectuée à partir d'ARN totaux, extraits de jeunes bourgeons de plants d'*Arabidopsis thaliana* d'écotype Col-0 âgés de 2 mois, d'oligo(dT) et de la SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) selon les recommandations du fabricant. L'ADNc double brin a été obtenu par amplification PCR, en se servant de la Taq polymérase haute-fidélité Phusion Master Mix (Finnzymes) et en utilisant 1 µl du produit de rétrotranscription comme matrice. Des amorces sens et antisens s'hybridant sur le gène d'intérêt permettent d'ajouter un site de restriction en amont de l'ATG initiateur et en aval du codon stop. Les amorces utilisées pour les différents clonages sont les suivantes :

Expression de protéines de fusion à la GST

	Amorce sens	Amorce antisens
At1g62940 EcoRI ATG / stop SacI	5'-GAGGAATTCCAATGGAGAGTCAAAGCAAGAAG-3'	5'-CTCGAGCTCCTACTTCTTGTGATGCTGAG-3'
At1g69500 XbaI ATG / stop HindIII	5'-GAGTCTAGACATGTCGTTGTTGGTTAT-3'	5'-CTCAAGCTTCTATGAACGTCTGGATACAGTA-3'
At4g35420 EcoRI ATG / Stop SacI	5'-GAGGAATTCCAATGGATCAAGCAAAGGGAAA-3'	5'-CTCGAGCTCTTATGGAAGAACAGTAGATAA-3'
At4g34850 EcoRI ATG / stop HindIII	5'-GAGGAATTCAATGGGAAGCATCGATGCTGC-3'	5'-CTCAAGCTTTCAGACATCAAGGTTTCGAG-3'
At1g02050 NcoI ATG / stop SacI	5'-GAGCCATGGAATGTCGAATTCTAGGATGAATG-3'	5'-CTAGAGCTCTTAGGAAGAGGTGAGGCTGC-3'
At3g59530 XbaI ATG / stop NcoI	5'-GAGTCTAGAGATGGAGAAGAAAGGCCAGCA-3'	5'-CTCCCATGGTCATTGATTGTTCAAAG-3'
At3g11980 EcorI ATG / stop NcoI	5'-GAGGAATTCTAATGGAGGCTCTCTTTGAG-3'	5'-CTCCCATGGTTAAGCTCTTCTTCAAGA-3'
At1g68540 XbaI ATG / stop NcoI	5'-GAGTCTAGAGATGTCGAGTATTTGGTAACTG-3'	5'-CTCCCATGGTTAGAGCAGACCCTTCTTCTG-3'
At3g42960 XbaI ATG / stop NcoI	5'-GAGTCTAGAAATGGCGAACTCAGACAAAAG-3'	5'-CTCCCATGGCTAGTTGTAGATAAAATCTCA-3'
At1g03390 XbaI ATG / stop NcoI	5'-GAGTCTAGAAATGGCTTTCATCCAAGA-3'	5'-CTCCCATGGTTATTTATGATCATTAAAGAT-3'

Les produits d'amplification PCR sont purifiés par extraction phénol/chloroforme, repris dans de l'eau, dosés puis digérés et ligués directement dans le plasmide pGEX-KG préalablement digéré par les mêmes enzymes de restriction. Chaque insert dans le plasmide recombinant a ensuite été séquencé, puis utilisé pour transformer *E. coli BL21-G612*.

2. Production hétérologue de la protéine par *E. coli*

Le clone *E. coli BL21-G612* désiré est étalé sur boîte LB contenant de l'ampicilline (50 µg/ml) et de la kanamycine (50 µg/ml), puis incubé à 37°C jusqu'à apparition des colonies. Une préculture dans 10 ml de LB contenant de l'ampicilline et de la kanamycine est réalisée avant d'ensemencer au 1/100ème une culture de 250 ml. La culture est incubée à 37°C pendant 3h30 – 4h00 ($A_{600nm} < 0,7$), puis celle-ci est refroidie dans un bac d'eau jusqu'à environ 20°C. La production de la protéine est alors induite par l'ajout d'IPTG (0,3 mM

final), et la culture est laissée sous agitation à température ambiante pendant 3 h30. La culture est centrifugée à 3000 g pendant 15 min à température ambiante puis le culot est repris dans 20 ml d'un tampon de lyse (PBS 1X avec une pastille de *Protease Inhibitor Cocktail*, Roche). Les bactéries sont lysées en utilisant la *French press* (2 passages à 700 psi), et le lysat est centrifugé à 10000 g et 4°C pendant 15 min. Le surnageant est prélevé puis dilué de sorte à avoir un volume final de 40 ml. Le surnageant est chargé sur une colonne glutathion-agarose (GSTrap 4B 1 ml, GE healthcare) à 0,8 ml/min. Après le passage du surnageant, la colonne est lavée en passant 10 volumes de la colonne de PBS, puis la protéine est éluée avec un tampon d'éluion (Tris-HCl 50 mM pH 8, 15 mM glutathion réduit) à 0,5 ml/min. Des fractions de 0,5 ml sont récupérées et analysées séparément par PAGE et coloration au bleu de Coomassie. Les meilleures fractions sont rassemblées, puis digérées à la thrombine (10 U/mg protéine) pendant 4 h dans la glace.

La purification de protéines en fusion avec les 6 histidines s'est déroulée selon les mêmes principes (voir le protocole GE healthcare HisTrap™ HP). Le tampon de lyse a été préparé par ajout d'une pastille de *Protease Inhibitor Cocktail* sans EDTA (Roche) pour ne pas inhiber la chromatographie d'affinité. La colonne utilisée a été confectionnée à partir d'une solution de billes HIS-select nickel affinity gel (Sigma). Les lavages ont été réalisés avec un tampon contenant 20 mM d'imidazole (MOPS pH 7,8 20 mM, 500 mM NaCl, Glycérol 15 %) et l'éluion avec 100 µL d'un tampon à 250 mM d'imidazole (MOPS pH 7,8 20 mM, 500 mM NaCl, Glycérol 15 %).

IX. Activités enzymatiques

1. Conditions d'incubation

Les conditions des activités enzymatiques de PKSA, PKSB et de ACOS5 sont décrites dans la publication (Grienenberger et al., 2010).

Les activités ACOS5 ont été mesurées dans les conditions suivantes : dans un volume final de 100 µl, 60 mM tampon phosphate pH 7,5, MgCl₂ 10 mM, ATP 5 mM, DTT 2,5 mM, CoA-SH 1 mM, acide gras (dissous dans 0,1 % Triton X-100) 0,2 mM, ACOS5 recombinante 5 µg. L'ensemble est assemblé dans la glace et mis à incuber à 30°C pendant 30 min, 1 h ou 2 h, puis stoppé par l'ajout de 10 µl de HCl 1N.

Les incubations PKS ont été réalisées dans les conditions suivantes: dans un volume final de 100 µl. 100mM tampon phosphate pH 7,0, Malonyl-CoA 0,1 mM (contenant ou non 25 nCi de [2-¹⁴C] malonyl-CoA), ester de CoA d'acide gras 0,1 mM et 5 µg d'enzyme recombinante. L'ensemble est assemblé dans la glace puis mis à incuber à 30°C pendant 1h. Les co-incubations ACOS5/PKS sont réalisées dans les conditions ACOS5. 30 min après le début de l'incubation avec ACOS5, PKS (5 µg) et du malonyl-CoA (0,1 mM final) sont ajoutés dans le milieu d'incubation puis incubés 1 h30 à 30 °C.

La démarche expérimentale pour détecter les activités TKPR est équivalente à celle des PKS, soit en co-incubant l'acide gras avec ACOS5 ou en donnant un ester CoA d'acide gras commercial pour substrat, 10 µg de TKPR recombinante et 1 mM de NADPH sont ajoutés en même temps que les PKS dans le milieu d'incubation, puis incubés 1 h30 à 30°C. Dans tous les cas, en fin de réaction, les polykétides sont extraits avec 500 µl d'acétate d'éthyle, évaporés sous azote puis repris dans 100 µl de méthanol.

2. Analyse des produits de réaction

L'analyse des produits froids est réalisée en UPLC-MS/MS par recherche des masses des produits selon les conditions décrites dans (Grienenberger et al., 2010). L'analyse des produits radiomarqués est faite sur plaque de silice (Merck, Silica gel 60 F254) dans un mélange acétate d'éthyle/hexane/acide acétique (63/27/5; v/v/v), puis révélé au phosphorimager (TyphoonTM FLA 7000 biomolecular imager Fuji).

X. Analyses des protéines

1. Extraction de protéines à partir de matériel végétal

Les tissus sont prélevés et congelés à -80°C jusqu'à leur utilisation. Les échantillons congelés sont réduits en poudre à l'aide d'un broyeur à billes. La poudre est reprise dans du tampon d'extraction (NaH₂PO₄ pH 7,5, 100 mM, DTT 10 mM) (1 ml/100 mg de poids frais) et broyée à nouveau. Le broyat obtenu est centrifugé à 13000 g, pendant 30 min à 4°C. Le surnageant est prélevé et la concentration en protéines solubles totales est déterminée par la méthode de Bradford (Bradford, 1976).

2. Séparation des protéines sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

Les gels de séparation (0,75 mm x 7 cm x 9 cm) sont composés de 12,5% de polyacrylamide (acrylamide/bisacrylamide, 37:1). Avant dépôt, les échantillons protéiques sont mélangés avec 20% (v/v) d'un tampon de charge (Tris-HCl 60 mM pH 6,8, β -mercaptoéthanol 5%, glycérol 10%, bleu de bromophénol 0,01% et SDS 1%) et chauffés à 100°C pendant 2 min pour une dénaturation complète des protéines. Le tampon d'électrophorèse est composé de glycine (150 mM), Tris-HCl pH 8,3 (20 mM), SDS 0,1%. La migration verticale est réalisée dans une cuve d'électrophorèse BioRad (Mini Protean 3) à une intensité de 20 mA par gel pour une tension de 100 à 120 V.

3. Révélation des protéines au bleu de Coomassie

Le gel d'électrophorèse est incubé 15 min dans la solution de coloration (bleu de Coomassie R250 0,25 %, méthanol 50 %, acide acétique 7 %). Une fois les bandes protéiques révélées, la décoloration du gel s'effectue dans un mélange acide acétique 7,5 % méthanol 30 %.

4. Transfert et immunodétection des protéines (western blot)

Après séparation par SDS-PAGE, les protéines sont transférées sur membrane Immobilon P (0,45 μ m, Millipore) pendant 1 h à 122 mA et 30 V dans le tampon de transfert de composition suivante : Tris-HCl pH 8,3 20 mM, glycine 150 mM et méthanol 20 %. Après le transfert, la membrane est incubée pendant 1 h à 37°C dans un tampon Lait (PBS 1x, lait en poudre 5%, Tween20 0,1 %), puis mise en contact avec l'anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt, dilué au 1/10000^{ème}, pendant 2 h à température ambiante.

La membrane est ensuite lavée 3 fois avec du tampon Lait, puis elle est mise en présence de l'anticorps secondaire GAR (Goat Anti-Rabbit) couplé à la phosphatase alcaline (dilué au 1/10000^{ème}), pendant 1 h à température ambiante. Cet anticorps secondaire permet la visualisation du complexe anticorps primaire/antigène. Après 3 lavages dans du tampon PBS, Tween 0,2%, la membrane est mise en contact avec le substrat de la phosphatase alcaline (Immun-Star : chemiluminescent protein detection systems – BioRad) et révélée sur

film radiographique.

5. Obtention d'anticorps spécifiques

Les lapins utilisés sont des femelles de souche Néo-Zélandaise de 2 à 2,5 kg (âgées de deux mois). Un premier prélèvement de sang sert de sérum pré-immun (témoin négatif). Puis, une émulsion d'antigène (200 µg) et d'adjuvant de Freund complet est injectée par voie intradermique. Un mois plus tard, le sang du lapin est prélevé à raison de 30 mL chaque semaine pendant un mois. Ensuite, une émulsion des deux tiers de la quantité initiale d'antigène et d'adjuvant de Freund incomplet est injectée au lapin par voie sous-cutanée. Environ douze jours plus tard, le lapin est anesthésié puis sacrifié. Un volume de 130 à 150 mL de sang est prélevé par voie intracardiaque, soit 70 à 80 mL de sérum.

XI. Tests d'interaction protéine-protéine

1. Test *in vitro* par HIS-Pull-down

Les gènes *At1g02050*, *At4g34850*, *At1g35420*, *At1g62940* d'Arabidopsis ont été clonés dans le vecteur pQE30Xa (appât) introduisant une étiquette 6XHIS et les gènes *At1g02050*, *At4g34850*, *At1g35420*, *At1g68540* et *At1g62940* dans le vecteur pGEX-KG (proie) (Addgene). Les protéines proie et appât ont été obtenues par expression dans la souche bactérienne SoluBL21 (Amsbio). Les protéines ont été purifiées comme décrit précédemment et les étiquettes GST ont été clivées. Pour les tests d'interaction *in vitro*, 10 µg de chaque protéine soluble ont été préincubées pendant 1 h à 4°C dans un tampon (MOPS pH 7,8 20 mM, 500 mM NaCl, Glycérol 15 %) pour un volume final de 300 µL. Ensuite, 80 µl de billes "His-selec Nickel affinity gel" (Sigma) ont été ajoutés et le tout mis sous agitation rotative pendant 1 h à 4°C. Comme contrôle négatif, chaque protéine proie a été incubée seule en présence des billes « HIS-select nickel affinity gel » pour tester la fixation aspécifique des protéines aux billes.

Les tubes sont ensuite centrifugés à 500 g à 4°C pendant 4 min. Trois lavages sont ensuite réalisés avec 300 µl de tampon (MOPS pH 7,8 20 mM, 500 mM NaCl, Glycérol 15 %, imidazole 20 mM). Suite à l'éluion des complexes par l'ajout de 100 µl de la solution de lavage additionnée de 250 mM d'imidazole, les protéines ont été séparées sur gel SDS-PAGE

12.5 % et transférées sur une membrane de nitrocellulose avant détection par western blot. Les contrôles montrent que les protéines proies n'ont pas été retenues sur les billes en l'absence de protéine appât.

2. Test *in vivo* par système double-hybride

Les levures AH109 ont été transformées simultanément par deux plasmides : l'un code pour la protéine recombinante ACOS5 fusionnée au domaine activateur AD de GAL4 (AD-ACOS5) et porte le gène de sélection de l'auxotrophie au tryptophane (*TRP1*), tandis que l'autre plasmide code pour les protéines PKSA, PKSB, TKPR1, TKPR2, CYP703 ou CYP704 fusionnées au domaine BD de liaison à l'ADN et porte le gène de sélection de l'auxotrophie à la leucine (*LEU2*). Les protéines de fusion exprimées possèdent un signal de localisation nucléaire permettant leur translocation au noyau, où se trouvent les gènes rapporteurs. La première étape consiste à sélectionner les levures transformées simultanément par les deux plasmides en les étalant sur un milieu tryptophane- (Trp-)/leucine- (Leu-). La deuxième étape consiste à déceler une éventuelle interaction entre les deux protéines d'intérêt. L'interaction des protéines en fusion avec AD et BD permettra la reconstitution du facteur de transcription GAL4 et la transcription subséquente des gènes rapporteurs Ade2, His3 et lacZ. La force d'interaction entre les deux protéines peut être estimée par la croissance des colonies sur des milieux de sélection à différentes stringences : déficients en adénine ou en histidine, ou par l'intensité de la coloration bleue sur les milieux contenant le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactoside (X-Gal).

Pour l'essai, les levures co-transformées étaient étalées sur un milieu Trp-/Leu- « Synthetic Dropout (SD) » (milieu contenant tous les acides aminés essentiels pour la croissance des levures en absence de l'Histidine utilisé pour la sélection) et incubées à 30°C pendant environ 3-6 jours. 5 colonies ont été repiquées pour ensemercer un milieu liquide (SD)/Leu-/Trp-. Différentes dilutions (1/5 ; 1/10 et 1/20) d'une solution à $A_{600nm} = 0,5$ ont été réalisées et 5 μ l déposés sur un milieu (SD)/Trp-/Leu- et (SD)/Trp-/Leu-/His-. La première lecture des résultats a été faite après 3 jours et la deuxième après 6 jours en se référant toujours aux témoins positifs et négatifs. Dans les mêmes conditions, la protéine du retinoblastome (ZmRb1) du maïs et la protéine RepA d'un geminivirus du blé (du genre Mastrevirus qui infecte les monocotylédones) ont été utilisées comme contrôle positif (Xie et al., 1996). Aucun bruit de fond n'a été observé.

3. Test d'interaction *in vivo* par l'utilisation de FLIM-FRET

Construction de protéines de fusion avec le fluorochrome GFP ou RFP

Afin de tester l'interaction entre les protéines encodées par les gènes *At1g02050*, *At4g34850*, *At1g35420*, *At1g68540*, *At1g62940*, *At1g01280* et *At1g69500*, les séquences codantes ont été insérées dans les vecteurs pB7FWG2 ou pB7RWG2 par recombinaison à partir du plasmide donneur pDONR221 (système Gateway, Invitrogen). Deux témoins négatifs d'interaction et un marqueur du RE ont été utilisés. Le fluorochrome mRFP couplé à l'extension HDEL en C-terminal (Robinson et al., 2007) ou couplé à l'ancre membranaire de la CYP51G1 d'*Arabidopsis* (fourni par Jean-Etienne Bassard, IBMP). Les constructions ont été exprimées transitoirement dans les feuilles de *N. benthamiana* par agroinfiltration. Pour cela, trois suspensions d'agrobactéries sont mélangées à volume équivalent. Les deux premières transformées avec les constructions dont on désire tester l'interaction et une suspension d'agrobactéries permettant l'expression de la protéine P19 (suppresseur de silencing du TBSV).

Acquisition de données par FLIM (Fluorescence-lifetime imaging microscopy)

La demie-vie de fluorescence de la protéine en fusion avec la GFP a été mesurée au moyen du système « LIFA frequency domain fluorescence lifetime imaging system » (Lambert Instruments, Roden, The Netherlands) pour une dizaine d'expériences de transformation indépendantes. L'expérience a été réitérée 2-3 fois pour obtenir suffisamment de données et réaliser une étude statistique par test de Student au moyen du logiciel BIO7.

RESULTATS

I. Caractérisation fonctionnelle de gènes impliqués dans le développement du pollen chez *Arabidopsis thaliana*

1. Contexte du projet de recherche

A mon arrivée au laboratoire, Etienne Grienberger avait fait des progrès significatifs dans l'étude du développement du grain de pollen et dans la fonction de sa paroi. L'analyse du gène *At2g19070* (*SHT*, Spermidine Hydroxycinnamoyl Transferase) avait permis d'identifier un nouvel acteur intervenant dans la formation du manteau pollinique. Ce gène est exprimé dans les cellules du tapétum. Il s'agit d'une acyltransférase de la famille des BAHD qui transfère 3 monomères féruloyl-CoA sur une molécule de spermidine. Lors de l'analyse de *SHT*, d'autres gènes potentiellement impliqués dans le métabolisme des phénylpropanoïdes avaient été sélectionnés car ils pouvaient être impliqués dans la biosynthèse du féruloyl-CoA, substrat de *SHT*. Ainsi une Coumarate Ligase like (*4CL-like*), est exprimée plus précocement que *SHT* et pouvait donc remplir ce rôle. Il a été démontré que la perte de sa fonction entraîne une stérilité mâle mais sans influencer l'accumulation des spermidines acylées. Le gène semble donc impliqué dans le développement du pollen mais pas dans la biosynthèse des substrats de *SHT*. Pendant qu'Etienne entreprenait l'étude du gène *4CL-like*, l'équipe de Carl Douglas à Vancouver publiait une étude détaillée de ce gène (de Azevedo Souza et al., 2009). Le gène code pour une acyl-CoA synthétase qui utilise les acides gras C16 et C18 comme substrats. La protéine s'accumule dans le tapétum de la plante sauvage et chez le mutant sa disparition entraîne une stérilité mâle. Ces résultats démontraient donc l'importance des acyl-CoAs dans la biosynthèse de la sporopollénine. Dans la suite du travail, notre sélection de gènes candidats a donc privilégié des gènes potentiellement impliqués dans le métabolisme des acides gras.

1.1. Stratégie de recherche

Les difficultés liées à la caractérisation biochimique des composants de la sporopollénine nous ont conduits à élaborer une nouvelle stratégie d'étude. Les nouveaux outils de la génomique permettent de générer des hypothèses de lien fonctionnel potentiel en

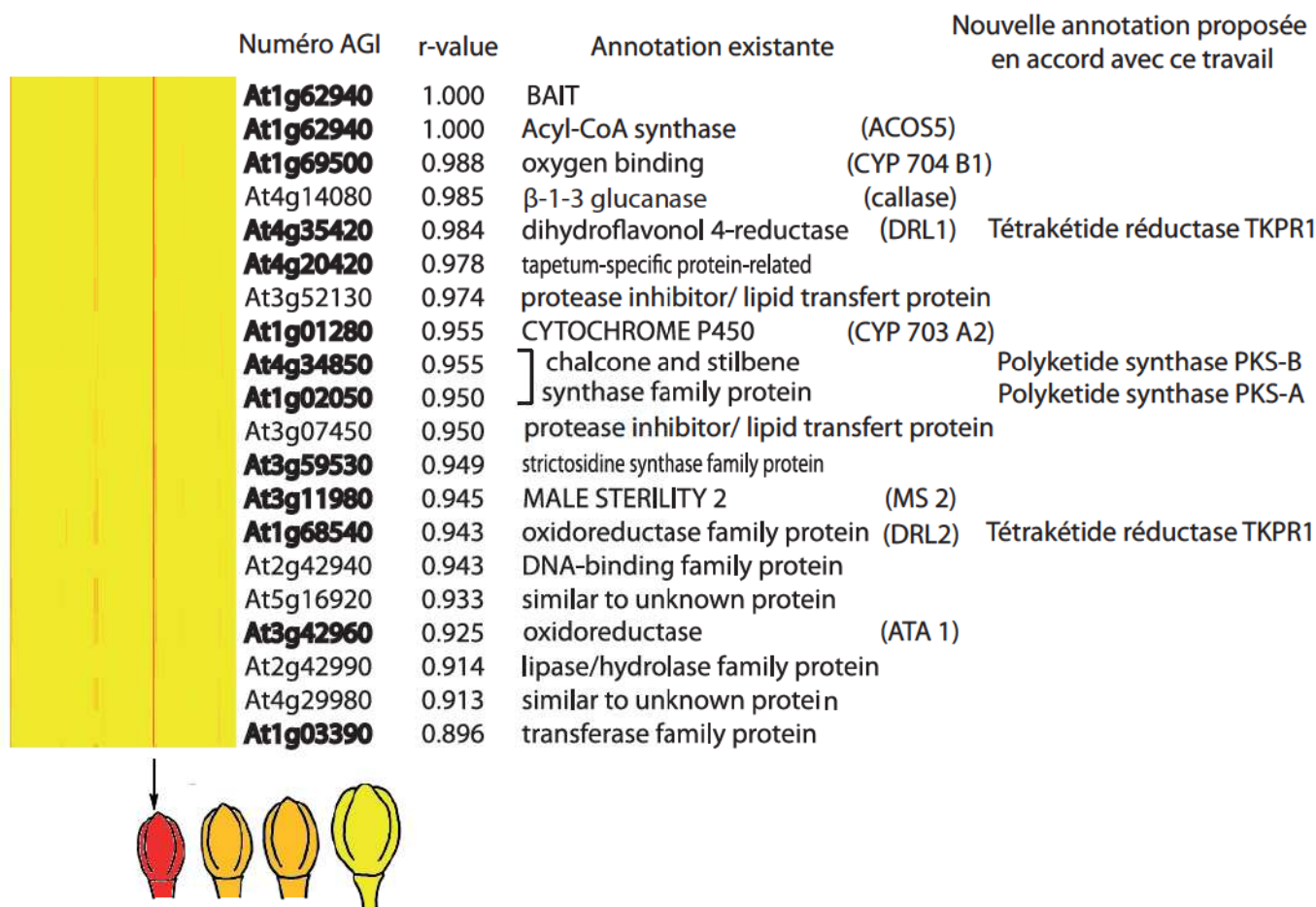


Figure III.1 Identification des gènes co-régulés avec la CoA ligase ACOS5 (At1g62940)

Le panneau de gauche est une représentation extraite des données de microarrays et montre l'expression quasi exclusive des gènes d'intérêt dans le jeune bourgeon floral (la forte expression d'un gène est représentée par une case rouge, une faible expression par une case jaune). Les scores de corégulation de Pearson (r-value) par rapport au gène At1g62940 ainsi que l'annotation indiquée sur le site TAIR (déduite de similarités de séquences ou de fonctions déjà caractérisées) sont indiqués à la droite des gènes. Les gènes indiqués en gras sont ceux dont nous avons entrepris l'étude. Les scores de corégulation ont été établis sur tout le transcriptome d'Arabidopsis à l'aide du serveur "expression Angler" à travers le set de microarrays disponible sur le site NASC à l'adresse :

http://bar.utoronto.ca/ntools/cgi-bin/ntools_expression_angler.cgi

identifiant de nouveaux gènes candidats sur la base de leur forte co-expression avec d'autres gènes déjà caractérisés. Cette stratégie utilise la puissance de la génétique inverse mais suppose d'être capable de produire les protéines recombinantes codées par les gènes candidats, de pouvoir mettre en place des tests biochimiques pour tester leurs activités, et idéalement, de visualiser les modifications métaboliques et morphologiques induites par les mutations dans les gènes. Les résultats obtenus lors de ma thèse ont validé cette stratégie et élargissent nos connaissances sur la structure et la formation de la paroi de cette forme de vie unique qu'est le grain de pollen.

1.2. Sélection de gènes candidats

Sachant que des gènes impliqués dans la même voie métabolique ont en général le même profil d'expression et que, dans le cas présent, les fleurs sont le site exclusif du métabolisme étudié, les données de co-régulation constituent un outil prédictif puissant, permettant de relier des gènes de fonctions inconnues à un ou plusieurs gènes dont la fonction est démontrée dans un processus donné.

Nous avons ainsi utilisé la base de données Expression Angler (Toufighi et al., 2005), http://bar.utoronto.ca/ntools/cgi-bin/ntools_expression_angler.cgi, qui compare l'expression d'un gène appât avec celle de tous les transcrits à travers des centaines d'expériences de micro-arrays puis calcule un score de co-régulation (figure III.1). Dans notre cas, le gène de référence utilisé code pour l'acyl-CoA synthétase, *ACOS5* (*At1g62940*) impliquée dans la formation des précurseurs de l'exine (de Azevedo Souza et al., 2009). 18 gènes ayant un coefficient de co-régulation élevé ont ainsi été trouvés. L'implication de plusieurs d'entre eux dans le développement pollinique était connu, démontrant la validité de cette stratégie ; *CYP703A2* (*At1g01280*) code pour une hydroxylase d'acides gras à cytochrome P450 (Morant et al., 2007) et *MS2* (*male sterility 2*, *At3g11980*) est annotée comme réductase d'acides gras (Aarts et al., 1997). *LAP3* (*less adherent pollen 3*, *At3g59530*) et *DRL1* (*dihydroflavonol 4-reductase like*, *At4g35420*) sont elles des protéines que l'on sait impliquées dans la biosynthèse de la sporopollénine mais pour lesquelles l'activité enzymatique n'est pas connue (Dobritsa et al., 2009a; Tang et al., 2009).

Mon travail de thèse a consisté à rechercher l'implication d'un certain nombre de ces gènes, présentés en gras dans la figure III.1, pour lesquels une fonction métabolique peut être prédite dans le développement pollinique.

2. Résumé des principaux résultats publiés

(Publication 1 Kim et al., 2010 ; Publication 2 Grienenberger et al., 2010)

2.1. Identification de polykétides synthétases et tetrakétide α -pyrone réductases intervenant dans la synthèse de la paroi pollinique

En se basant sur une similarité de séquence globale, une fonction hypothétique a été proposée pour certains des gènes co-régulés (figure III.1). Suite à la caractérisation d'ACOS5 qui synthétise des esters de CoA d'acides gras, nous avons noté la présence de deux polykétides synthétases de type III (PKSA et B) qui catalysent la condensation d'unités malonyl-CoA avec un large panel d'esters de CoA accepteurs. Leur implication dans le développement du pollen n'était pas connue mais ils étaient de bons candidats à l'utilisation des esters de CoA produits par ACOS5. Parmi les gènes co-régulés se trouvent également deux oxydoréductases DRL1 et DRL2 (dihydroflavonol reductase-like). Nous avons également entrepris de les étudier. Elles seront nommées TKPR1 et TKPR2 en référence à leur activité enzymatique qui sera décrite plus loin.

L'étude de l'implication des gènes sélectionnés dans la formation de la paroi pollinique a débuté par la production des protéines recombinantes par des bactéries, puis par leur purification par chromatographie d'affinité. Ces protéines ont alors été utilisées pour l'obtention d'anticorps polyclonaux spécifiques après injection à des lapins. En utilisant ces anticorps nous avons caractérisé le patron d'expression des protéines PKSA, PKSB, TKPR1 et TKPR2 par immunoblotting. Les résultats indiquent que ces protéines sont toutes spécifiquement exprimées au sein des bourgeons floraux et préférentiellement dans les plus jeunes (figure 2 et figure supplémentaire 1 de la publication 1 et figure 1 de la publication 2). La détermination plus précise du patron d'expression spatiotemporel des gènes a été ensuite réalisée par immunolocalisation sur des coupes de bourgeons floraux à différents stades de développement. Nous avons dès lors constaté que les protéines s'accumulaient spécifiquement dans les cellules du tapétum dès la formation des tétrades jusqu'à la fin de développement de la paroi pollinique avec des cinétiques d'accumulation légèrement différentes (figure 4, publication 1 et figure 2, publication 2). Puisque les précurseurs d'exine sont formés au sein de cette couche cellulaire, ces profils d'expression constituaient une première indication suggérant que ces quatre protéines interviennent bien dans la synthèse de l'exine.

Caractérisation fonctionnelle de gènes impliqués dans le développement du pollen chez Arabidopsis thaliana

L'analyse du rôle des protéines PKSA, PKSB, TKPR1 et TKPR2 a ensuite été réalisée par l'examen des phénotypes de mutants T-DNA pour les gènes étudiés. Ceux-ci ont été obtenus auprès de banques de mutants et des plantes homozygotes KO ont été sélectionnées par PCR (figure 5 de publication 1 et figure 3, publication 2). L'observation par microscopie optique et électronique des anthères et du pollen de mutants *pksa* et *pksb* inactivés pour l'expression de ces gènes révèle d'importants défauts de structure de l'exine se traduisant par une semi stérilité (figure 6, 7, 8 et 9 publication 1 et figure supplémentaires 4, 5, 6 et 7 publication 1). La coloration des grains de pollen à l'Auramine O, qui fixe spécifiquement l'exine, a révélé la présence de zones sans exine en contraste avec le réseau d'exine régulier autour du grain de pollen sauvage. Ces observations ont été affinées par l'utilisation d'un microscope électronique à balayage qui a montré que chez les simples mutants *pksa* et *pksb*, le patron de l'exine est visible, mais son épaisseur a diminué et le réseau est modifié. Le double mutant *pksa pksb*, obtenu en croisant les simples mutants entre eux est, lui, totalement stérile, démontrant une complémentarité de fonction pour les deux gènes. Les mêmes expériences effectuées sur les grains de pollen des mutants *tkpr1* et *tkpr2* ont révélé que les grains de pollen *tkpr1* dégénèrent pour la plupart et ceux restant sont dépourvus d'exine (figures 4, 5 et 6, publication 2). Ce mutant est en conséquence complètement stérile alors que les plantes mutées privées de la fonction de la protéine TKPR2 ne présentent que de légers défauts au niveau de la paroi pollinique sans effet sur la fertilité de la plante. Dans l'ensemble, ces observations confirment bien que les quatre gènes interviennent dans la synthèse de l'exine.

2.2. Activités enzymatiques des protéines recombinantes PKSA, PKSB, TKPR1 et TKPR2

Nous savions que les polykétides synthétases de type III (PKSs) que l'on trouve chez les plantes mais aussi chez les bactéries et les champignons catalysent la condensation d'unités malonyl-CoA avec un large panel d'esters de CoA accepteurs (Mizuuchi et al., 2008). L'hypothèse était donc que les enzymes PKSA et PKSB impliqués dans la biosynthèse de l'exine condensent les acyl-CoAs synthétisés par ACOS5 à des unités de malonyl-CoA. Les protéines recombinantes correspondantes ont été clonées dans un vecteur d'expression bactérien en fusion avec un tag GST à l'extrémité N-terminale et divers esters de CoA d'acides gras ont été synthétisés au laboratoire en incubant les acides gras avec ACOS5. L'analyse du milieu d'incubation par LC-MS/MS nous a permis de montrer que les protéines

recombinantes, PKSA et PKSB forment des tri- et tétra-kétides par condensation (figure 10, 11 et 12 publication 1) à partir de différents esters de CoA d'acides gras.

Des études phylogénétiques indiquaient que les deux réductases, co-exprimées avec PKSA et PKSB, appartenaient à deux clades différents de la famille des réductases/déshydrogénases. Or les polykétides présentent des fonctions cétones qui sont de potentielles cibles pour une réaction de réduction. C'est pourquoi les protéines recombinantes produites et purifiées à partir de bactéries ont été incubées en présence des produits de synthèse des PKSs. L'analyse en LC-MS/MS a ainsi permis d'établir que les tétrakétides α -pyrones sont réduits mais pas les trikétides α -pyrones formés. Ces enzymes réduisent la fonction cétone de la chaîne latérale des tétrakétides en présence de NADPH+H⁺ comme démontré par le profil de fragmentation du produit (figure 7 et 8 publication 2). Les protéines ont donc été nommées TETRAKETIDE α -PYRONE REDUCTASE1 (TKPR1) et TKPR2.

2.3. Les protéines PKSA, PKSB et TKPR1 sont associées au réticulum endoplasmique, TKPR2 est cytoplasmique

Dans le but de mieux comprendre l'organisation cellulaire de la voie métabolique caractérisée, les protéines PKSA, PKSB, TKPR1 et TKPR2 ont été fusionnées au fluorochrome eGFP (green fluorescent protein) en C-terminal. Ces protéines ont été exprimées transitoirement dans les feuilles de *Nicotiana benthamiana*. Un marqueur du réticulum couplé à la RFP (red fluorescent protein) a été co-exprimé dans les mêmes cellules. La localisation a été déterminée au moyen d'un microscope confocal. Le profil de fluorescence des protéines PKSA, PKSB et TKPR1 est caractéristique d'une localisation dans le RE et se superpose parfaitement à celui du marqueur du RE. Au contraire, la protéine TKPR2 présente un profil de fluorescence typique d'une protéine cytoplasmique (figure 13 publication 1 et 9 publication 2)

2.4. Les gènes PKSA, PKSB, TKPR1 et TKPR2 constituent une voie de biosynthèse conservée au cours de l'évolution

L'ensemble de ces résultats a ainsi permis d'identifier une voie biosynthétique majeure de la formation de monomères de sporopollénine à partir d'esters de CoA d'acides gras. Afin de comprendre si cette voie de biosynthèse est conservée chez les autres espèces végétales, une recherche d'homologues les plus proches de chaque gène dans différentes espèces a été

Caractérisation fonctionnelle de gènes impliqués dans le développement du pollen chez Arabidopsis thaliana

conduite. Des orthologues potentiels des gènes *PKSA*, *PKSB*, *TKPR1* et *TKPR2* ont été identifiés dans différentes lignées d'angiospermes ainsi que chez la mousse *Physcomitrella patens*, soulignant par-là l'importance de leur activité enzymatique et l'ubiquité du rôle qu'elles jouent au sein des végétaux (figure 1 publication 1 et figure 10 publication 2).

L'ensemble de ces résultats a fait l'objet de deux publications en collaboration avec le laboratoire de C. Douglas à Vancouver.

Publication 1

- Sung Soo Kim, Etienne Grienberger, Benjamin Lallemand, Che C. Colpitts, Sun Young Kim, Clarice de Azevedo Souza, Pierrette Geoffroy, Dimitri Heintz, Daniel Krahn, Markus Kaiser, Erich Kombrink, Thierry Heitz, Dae-Yeon Suh, Michel Legrand, and Carl J. Douglas. *LAP6/POLYKETIDE SYNTHASE A and LAP5/POLYKETIDE SYNTHASE B* encode hydroxyalkyl α -pyrone synthases required for pollen development and sporopollenin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*, Plant Cell 2010, vol. 22 no. 12: 4045-4066.

Publication 2

- Etienne Grienberger, Sung Soo Kim, Benjamin Lallemand, Pierrette Geoffroy, Dimitri Heintz, Clarice de Azevedo Souza, Thierry Heitz, Carl J. Douglas, and Michel Legrand. Analysis of TETRAKETIDE α -PYRONE REDUCTASE function in *Arabidopsis thaliana* reveals a previously unknown, but conserved, biochemical pathway in sporopollenin monomer biosynthesis. Plant Cell 2010, vol. 22: 4067-4083.

LAP6/POLYKETIDE SYNTHASE A and LAP5/POLYKETIDE SYNTHASE B Encode Hydroxyalkyl α -Pyrone Synthases Required for Pollen Development and Sporopollenin Biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*

Sung Soo Kim,^{a,1} Etienne Grienenberger,^{b,1,2} Benjamin Lallemand,^b Che C. Colpitts,^c Sun Young Kim,^c Clarice de Azevedo Souza,^{a,3} Pierrette Geoffroy,^b Dimitri Heintz,^d Daniel Krahn,^e Markus Kaiser,^e Erich Kombrink,^f Thierry Heitz,^b Dae-Yeon Suh,^c Michel Legrand,^b and Carl J. Douglas^{a,4}

^a Department of Botany, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia V6T 1Z4, Canada

^b Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, Unité Propre de Recherche 2357 du Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Strasbourg, 67084 Strasbourg Cedex, France

^c Department of Chemistry and Biochemistry, University of Regina, Regina, Saskatchewan S4S 0A2, Canada

^d Plate-Forme d'Analyses Métaboliques de l'Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, Institut de Botanique, 67083 Strasbourg Cedex, France

^e Zentrum für Medizinische Biotechnologie, Fachbereich Biologie und Geographie, Universität Duisburg-Essen, 45117 Essen, Germany

^f Max Planck Institute for Plant Breeding Research, Department of Plant-Microbe Interactions, 50829 Cologne, Germany

Plant type III polyketide synthases (PKSs) catalyze the condensation of malonyl-CoA units with various CoA ester starter molecules to generate a diverse array of natural products. The fatty acyl-CoA esters synthesized by *Arabidopsis thaliana* ACYL-COA SYNTHETASE5 (ACOS5) are key intermediates in the biosynthesis of sporopollenin, the major constituent of exine in the outer pollen wall. By coexpression analysis, we identified two *Arabidopsis* PKS genes, POLYKETIDE SYNTHASE A (PKSA) and PKSB (also known as LAP6 and LAP5, respectively) that are tightly coexpressed with ACOS5. Recombinant PKSA and PKSB proteins generated tri- and tetraketide α -pyrone compounds in vitro from a broad range of potential ACOS5-generated fatty acyl-CoA starter substrates by condensation with malonyl-CoA. Furthermore, substrate preference profile and kinetic analyses strongly suggested that in planta substrates for both enzymes are midchain- and ω -hydroxylated fatty acyl-CoAs (e.g., 12-hydroxyoctadecanoyl-CoA and 16-hydroxyhexadecanoyl-CoA), which are the products of sequential actions of anther-specific fatty acid hydroxylases and acyl-CoA synthetase. PKSA and PKSB are specifically and transiently expressed in tapetal cells during microspore development in *Arabidopsis* anthers. Mutants compromised in expression of the PKS genes displayed pollen exine layer defects, and a double *pksa pksb* mutant was completely male sterile, with no apparent exine. These results show that hydroxylated α -pyrone polyketide compounds generated by the sequential action of ACOS5 and PKSA/B are potential and previously unknown sporopollenin precursors.

INTRODUCTION

Microsporogenesis and pollen development are complex processes that take place during flower development, starting with


¹ These authors contributed equally to this work.


² Current address: Department of Botany, University of British Columbia, Vancouver, BC V6T 1Z4, Canada.


³ Current address: Department of Plant and Microbial Biology, University of California, Berkeley, CA 94720.

⁴ Address correspondence to carl.douglas@ubc.ca.

The authors responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (www.plantcell.org) are: Michel Legrand (michel.legrand@ibmp-cnrs.unistra.fr) and Carl J. Douglas (carl.douglas@ubc.ca).

 Some figures in this article are displayed in color online but in black and white in the print edition.

 Online version contains Web-only data.

 Open Access articles can be viewed online without a subscription. www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.110.080028

the initiation of stamen primordia and leading to the formation of two microgametes per mature pollen grain. These developmental events involve precisely controlled cellular processes, including cell division, cell differentiation, and cell death (Sanders et al., 1999; Scott et al., 2004; Ma, 2005). In *Arabidopsis thaliana*, anther development has been divided into stages based on anatomical, morphological, cellular, and molecular events (Sanders et al., 1999; Scott et al., 2004; Ma, 2005). At the beginning of anther cell differentiation, four clearly defined locules are established and visible pollen mother cells appear. Subsequent to this, the pollen mother cells undergo meiosis and tetrads are formed, connected by a callose wall. Once the callose wall degenerates to release free microspores, they become vacuolated, and the pollen wall becomes visible. Microspores continue to enlarge and develop, and the tapetum layer, a maternal cell layer that surrounds the inner side of the anther locules, starts to degenerate. At the end of anther development, the tapetum cell layer completely degenerates, and mature pollen grains fill the

locules and are released by anther dehiscence (Sanders et al., 1999).

A critical event during pollen maturation is the formation of the pollen surface structure. The pollen wall represents one of the most complex plant cell walls, with contributions from both the sporophyte and gametophyte generations. The major pollen wall components are a microspore-derived cellulosic primexine synthesized by the developing haploid microspores themselves at the tetrad stage (Blackmore et al., 2007), a thick exine deposited on the outer surface of the primexine largely after the release of free microspores, and a pectocellulosic intine produced by developing microspores and male gametophytes (Blackmore et al., 2007). In contrast with the primexine and intine, the exine is maternally derived, and exine constituents are produced in the sporophytic tapetum cell layer (Piffanelli et al., 1998). These exine constituents are secreted into the locules and incorporated into the exine by polymerization on the surface of the primexine (Piffanelli et al., 1998; Scott et al., 2004; Ma, 2005), where it often assumes a characteristic reticulate pattern, consisting of baculae and tecta. The final component of the pollen wall is the lipid-rich pollen coat, or tryphine, which is deposited onto the exine surface. Pollen coat components accumulate in tapetum cells and are released into locules during the course of tapetum cell degeneration (Ma, 2005).

The main constituent of exine is sporopollenin, an extremely robust and durable biopolymer found in the spores of bryophytes and ferns and in pollen exine of seed plants (Bohne et al., 2003). The chemical composition of sporopollenin remains poorly characterized because it is extremely resistant to chemical and biological degradation procedures (Bubert et al., 2002; Vizcay-Barrena and Wilson, 2006). However, available data are consistent with a sporopollenin polymer consisting of phenolic and fatty acid-derived constituents that are covalently coupled by ether and ester linkages (Rozema et al., 2001; Bubert et al., 2002; Ahlers et al., 2003). Progress has been made in identifying genes and enzymes that are involved in sporopollenin biosynthesis and exine formation during pollen development and has revealed that enzymes involved in fatty acid metabolism play key roles in these events. For example, the *Arabidopsis* *MALE STERILITY2* (*MS2*) gene, defined by the *ms2* male-sterile mutation, is required for exine formation and encodes a predicted fatty acyl-CoA reductase (Aarts et al., 1997). Expression of *MS2* in *Escherichia coli* results in the production of alcohols from endogenous *E. coli* fatty acids (Doan et al., 2009), supporting a function in fatty acid metabolism. Loss of function of the *FACELESS POLLEN1/WAX2/YRE/CER3* gene results in defects in both exine and epicuticular wax deposition, and the gene encodes a putative enzyme of unknown function presumably involved in both wax biosynthesis and pollen wall formation (Ariizumi et al., 2003; Chen et al., 2003; Rowland et al., 2007).

Recently, *Arabidopsis* genes encoding the cytochrome P450 enzymes of CYP703A2 and CYP704B1 have been shown to be involved in the biosynthesis of sporopollenin, since mutants show severe to moderate effects in exine deposition and pollen grain development (Morant et al., 2007; Dobritsa et al., 2009). In vitro assays indicate that the enzymes catalyze hydroxylation of medium- to long-chain fatty acid substrates. CYP703A2 is an in-chain hydroxylase with substrate preference for lauric acid

(C12:0), whereas CYP704B1 catalyzes the ω -hydroxylation of long-chain fatty acids (Morant et al., 2007; Dobritsa et al., 2009). In addition, we recently showed that *ACYL-COA SYNTHETASE5* (*ACOS5*) encodes a fatty acyl-CoA synthetase that plays an essential role in exine formation and sporopollenin biosynthesis in *Arabidopsis*, since the *acos5* mutant is completely male sterile, with a defective pollen wall lacking recognizable exine (de Azevedo Souza et al., 2009). In vitro assays indicate that *ACOS5* acts on hydroxyl medium- to long-chain fatty acids to generate the corresponding fatty acyl-CoA esters likely to be central intermediates required for sporopollenin biosynthesis in tapetum cells (de Azevedo Souza et al., 2009).

These results are consistent with a sporopollenin structure that incorporates hydroxylated fatty acids coupled via ester and ether linkages (Guilford et al., 1988; Ahlers et al., 2000, 2003; Morant et al., 2007; de Azevedo Souza et al., 2009), but the exact chemical nature of the sporopollenin polymer and sporopollenin precursor components still remains to be elucidated. Information on such components may come from enzymes encoded by genes that are coregulated with *ACOS5* and other genes involved in sporopollenin biosynthesis. Among such coregulated genes is *Arabidopsis* *DIHYDROFLAVONOL 4-REDUCTASE LIKE1* (*DRL1*)/*TETRAKETIDE α -PYRONE REDUCTASE* (*TKPR1*) (Grienenberger et al., 2010), which is required for male fertility and exine formation (Tang et al., 2009). *DRL1/TKPR1* encodes a reductase similar to *DIHYDROFLAVONOL 4-REDUCTASE*, involved in flavonoid metabolism, and plays a pivotal role in sporopollenin precursor biosynthesis as discussed in the companion article (Grienenberger et al., 2010). Recently, it was reported that the enzymes closely related to chalcone synthase (*CHS*) encoded by *At1g02050* (*LESS ADHESIVE POLLEN [LAP6]/POLYKETIDE SYNTHASE A [PKSA]*) and *At4g34850* (*LAP5/PKSB*) catalyze the sequential condensation of a starter acyl-CoA substrate with malonyl-CoA molecules to produce alkylpyrones in vitro (Mizuuchi et al., 2008; Dobritsa et al., 2010) and that the corresponding enzymes are involved in exine formation (Dobritsa et al., 2010).

Polyketide synthases (PKSs) are ubiquitous enzymes that generate a vast array of natural products and are classified as type I, II, and III enzymes based on their architectures (Austin and Noel, 2003). PKSs catalyze the decarboxylative condensation of a variety of acyl-CoA starter molecules with varying numbers of malonyl-CoA units (Austin and Noel, 2003; Saxena et al., 2003; Funa et al., 2006; Funabashi et al., 2008; Mizuuchi et al., 2008; Rubin-Pitel et al., 2008). Type III PKSs are ubiquitous in vascular plants as well as nonvascular plants such as *Physcomitrella patens* (Austin and Noel, 2003; Koduri et al., 2010), and plant-specific type III PKSs synthesize diverse natural products that play roles in UV photoprotection, antimicrobial defense, flower pigmentation, and pollen fertility. The best-studied type III PKS is *CHS*, which carries out the first committed step in flavonoid biosynthesis by catalyzing the sequential decarboxylative addition of three acetate units from malonyl-CoA to a *p*-coumaryl-CoA starter molecule derived from the general phenylpropanoid pathway. Moreover, other members of the type III PKS superfamily in plants use linear acyl-CoAs of varying length (C2 to C20) as starter substrates and give rise to a large variety of metabolites (Austin and Noel, 2003; Abe et al., 2004, 2005; Mizuuchi et al., 2008; Flores-Sanchez and Verpoorte, 2009).

We now significantly extend previous studies (Dobritsa et al., 2010) to show that the plant-specific CHS-like type III PKSs *LAP6/PKSA* and *LAP5/PKSB* are coexpressed with *ACOS5*, are specifically and transiently expressed in tapetum cells, are required for exine formation and development, and function at specific stages of microspore development. Furthermore, we show that *LAP6/PKSA* and *LAP5/PKSB* encode enzymes that catalyze the condensation of hydroxy fatty acyl-CoA esters synthesized by *ACOS5* with malonyl-CoAs to yield triketide and tetraketide α -pyrones and that *PKSA* has a strong in vitro preference for medium-chain hydroxy fatty acyl-CoAs that, based on in vitro data, may be preferentially synthesized by *ACOS5*. Our genetic analyses also showed that *LAP6/PKSA* and *LAP5/PKSB* have overlapping but partially distinct functions in exine development. Combined with the finding that *PKSA* and *PKSB* preferentially localize to the endoplasmic reticulum (ER), where they may form part of a metabolon with upstream and downstream enzymes, these data illuminate the important role played by these enzymes in an ancient and evolutionarily conserved biochemical pathway or pathways required for the biosynthesis of polyketide sporopollenin precursors.

RESULTS

Analysis of *ACOS5* Coexpressed Genes

Previously we reported that *ACOS5* encodes a fatty acyl-CoA synthetase required for sporopollenin biosynthesis in *Arabidopsis* (de Azevedo Souza et al., 2009). To define other potential enzymes in the sporopollenin biosynthetic pathway, we used data mining tools to identify coexpressed genes in public global gene expression data sets. Using the Correlated Gene Search tool (<http://prime.psc.riken.jp>), we queried 237 microarray experiments in the Tissue and Development data set, using a cutoff Pearson coexpression coefficient (r^2) of 0.80. This analysis identified 35 coexpressed genes, most of unknown function. Among these coexpressed genes, several have been shown to encode enzymes involved in sporopollenin biosynthesis, such as *MS2* (At3g11980), *CYP703A2* (At1g01280), and *DRL1* (At4g35420) (Aarts et al., 1997; Morant et al., 2007; Tang et al., 2009). Among the coexpressed genes, we focused on those that encode enzymes that could use the potential fatty acyl-CoA product(s) generated by the *ACOS5* as substrate(s) and therefore might be important in sporopollenin biosynthesis. Two of the most promising potential candidates were genes annotated as encoding plant-specific type III PKSs, *LAP6/PKSA* (At1g02050) and *LAP5/PKSB* (At4g34850), which were previously reported to generate triketide and tetraketide α -pyrone compounds using fatty acyl-CoAs (up to 20 carbon chain length) as a starter substrates (Mizuuchi et al., 2008) and were strongly coexpressed with *ACOS5* (r^2 for *LAP6/PKSA* of 0.94; r^2 for *LAP5/PKSB* of 0.99). To facilitate their description and represent their enzymatic function for sporopollenin biosynthesis in the following paragraphs, genes and proteins corresponding to *At1g02050* and *At4g34850* are referred to as *PKSA* and *PKSB*, respectively, consistent with the established nomenclature of Mizuuchi et al. (2008).

PKSA and *PKSB*-Like Genes Are Conserved in Land Plant Lineages

To investigate a potential conserved function for *PKSA* and *PKSB* genes in pollen wall development, we performed in silico searches of the full genome sequences of *Arabidopsis*, poplar (*Populus* spp), rice (*Oryza sativa*), and *Physcomitrella patens* using *PKSA* and *PKSB* as queries to retrieve potential *PKSA*- and *PKSB*-related PKS genes in these plants (see Supplemental Table 1 online). We also retrieved the PKS-related *Nicotiana sylvestris* *CHSLK*, *Silene latifolia* *Chs*, and *Pinus radiata* *CHS1* genes, previously shown to have high expression in male flowers or anthers (Atanassov et al., 1998; Walden et al., 1999; Ageez et al., 2005) and generated an unrooted maximum likelihood tree of aligned CHS and PKS-related protein sequences. This analysis, shown in Figure 1, indicated that *PKSA* and *PKSB* are located in two distinct PKS subclades that are clearly distinct from the more distantly related clade containing the bona fide *Arabidopsis* and *Physcomitrella* *CHS* genes and other putative *CHS* genes from poplar and rice. Each subclade including either *PKSA* or *PKSB* contains homologs from the fully sequenced poplar and rice genomes, as well as the rice or *Silene* homologs known to be expressed in male organs. According to this analysis, the *Pinus CHS1* gene is a *PKSA/B* homolog basal to the angiosperm *PKSA* and *PKSB* clades, and the *Physcomitrella* *PKS* (*CHS10*) and *CHS* genes are basal to the tracheophyte *PKSA/B* and *CHS* clades, respectively (Figure 1). These data indicate that *PKSA/B* clade PKS genes arose early in land plant evolution and may have common roles in male organ or spore development in land plant lineages.

Tapetum-Specific Expression of *PKSA* and *PKSB* Proteins

To test possible functions of the *Arabidopsis* *PKSA* and *PKSB* proteins in male organ development, first we used quantitative RT-PCR to analyze the expression of *PKSA* and *PKSB* in different *Arabidopsis* organs. Expression profiles are shown in Figure 2A. Both genes were preferentially expressed in flowers, and *PKSB* transcripts were detected exclusively in this organ. We also assayed *PKSA* and *PKSB* protein levels in various organs using immunoblots of fractionated protein extracts reacted with specific polyclonal antibodies raised against the recombinant *PKSA* and *PKSB* proteins. Both *PKSA* and *PKSB* proteins were preferentially detected in flowers, and little or no signal could be detected in extracts from other organs (Figure 2B). Analysis of *PKSA* and *PKSB* protein accumulation over the course of flower bud development showed that the two proteins had similar but distinct accumulation patterns: both *PKSA* and *PKSB* were most abundant in the youngest flower buds tested, and levels declined as flowers matured (see Supplemental Figure 1 online). However, the *PKSB* protein was detected only in the earliest stage assayed, whereas *PKSA* protein levels decreased more slowly in more mature flowers (see Supplemental Figure 1 online). The specificity of the *PKSA* and *PKSB* antibodies was demonstrated in immunoblotting experiments with the purified recombinant proteins. Each antiserum was shown to recognize the cognate protein, and cross-reactivity was not detected with the other PKS recombinant protein (see Supplemental Figure 2 online).

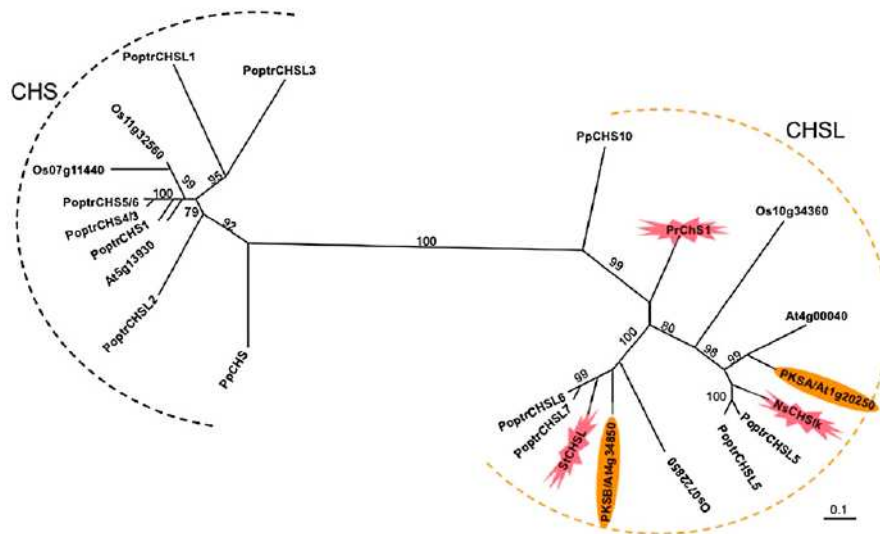


Figure 1. Phylogenetic Analysis of CHS and CHSL Protein Sequences from Land Plants.

Sequences retrieved from the complete genome sequences of *Arabidopsis* (At), poplar (Poptr), rice (Os), and *Physcomitrella* (Pp), as well as selected sequences from *Silene* (St), pine (Pr), and *N. sylvestris* (Ns) were included in the maximum-likelihood tree built using 1000 bootstrap replicates in PhyML 2.4.4. Bootstrap values are indicated on branches (out of 100). The *Arabidopsis* PKSA and PKSB proteins are highlighted (ovals). The proteins encoded by genes known to be expressed in tapetum cells during anther development are indicated by a flash. Protein sequences used in this analysis are given in Supplemental Data Set 1 online, and the alignment is available in Supplemental Data Set 2 online. Bar = 0.1 amino acid substitutions. [See online article for color version of this figure.]

To investigate the spatio-temporal patterns of *PKSA* and *PKSB* expression and *PKSA* and *PKSB* protein accumulation in anthers, we performed both in situ hybridization and immunolocalization experiments. Because *PKSA* and *PKSB* share 62.9% nucleotide identity and could potentially cross-hybridize, the specificity of the *PKSA*- and *PKSB*-derived riboprobes used for in situ hybridization analysis was demonstrated by DNA gel blotting, showing that both probes hybridized specifically with the target templates, with no detectable cross-hybridization (see Supplemental Figure 3 online). To elucidate the specific expression patterns of *PKSA* and *PKSB*, these RNA probes were hybridized to sections of developing wild-type flowers (Figure 3) focusing on anther stages 6 to 11 as defined by Sanders et al. (1999), during which free microspores are generated and sporopollenin-containing exine is deposited. Both *PKSA* and *PKSB* were strongly and transiently expressed in the tapetum cell layer of developing anthers. Whereas the hybridization signal was largely specific to tapetal cells, low levels of signal appeared to be present in stage 7 tetrads, so that a function in microspores cannot be excluded. Interestingly, the temporal patterns of expression in the developing tapetum were slightly different. *PKSA* expression was first detected at stage 6, and by stage 7, strong hybridization was detected in the tapetum. By stage 8, *PKSA* hybridization to tapetum cells had weakened, and at stage 11, it had disappeared. By contrast, *PKSB* expression was initiated at stage 7, and maximal hybridization was seen in the tapetum at stage 8.

The *PKSA*- and *PKSB*-specific antibodies were used for immunolocalization experiments in which similar stages of anther development were examined. Considerable accumulation of

PKSA and *PKSB* proteins in tapetum cells was detected by stage 8 (Figure 4). *PKSA* remained abundant in the tapetum through stage 10, whereas *PKSB* showed more transient abundance, with maximum accumulation at stage 8 and a rapid decrease in abundance by stage 9.

Identification and Phenotypic Analysis of *PKSA* and *PKSB* Loss-of-Function Alleles

To test the roles of *PKSA* and *PKSB* in pollen development and male fertility, we obtained two independent T-DNA insertion lines (*pkas-1* and *pkas-2*) for *PKSA* and three independent T-DNA insertion lines (*pkbs-1*, *pkbs-2*, and *pkbs-3*) for *PKSB* from public collections (Alonso et al., 2003). The locations of each T-DNA insertion in the *PKSA* and *PKSB* genes were verified by sequence analysis (Figure 5A). *PKSA* and *PKSB* expression in the insertion lines was assayed by RT-PCR, using template cDNAs derived from both wild-type and mutant flowers (Figure 5B), and little or no *PKSA* or *PKSB* expression was detected. Furthermore, in *pkas-1* and *pkbs-2* insertion lines, no protein accumulation could be detected by immunoblotting protein extracts using *PKSA*- and *PKSB*-specific antibodies (Figure 5C). This analysis suggested that each of the five alleles is a strong loss-of-function allele of *PKSA* or *PKSB*.

While this work was in progress, another group reported that plants homozygous for *pkas* or *pkbs* loss-of-function alleles have morphological defects in exine structure but were fertile (Dobritsa et al., 2010). To examine pollen morphology of *pkas* and *pkbs* mutants in more detail and at greater resolution, pollen grains from *pkas-1*, *pkas-2*, *pkbs-1*, and *pkbs-2* homozygotes

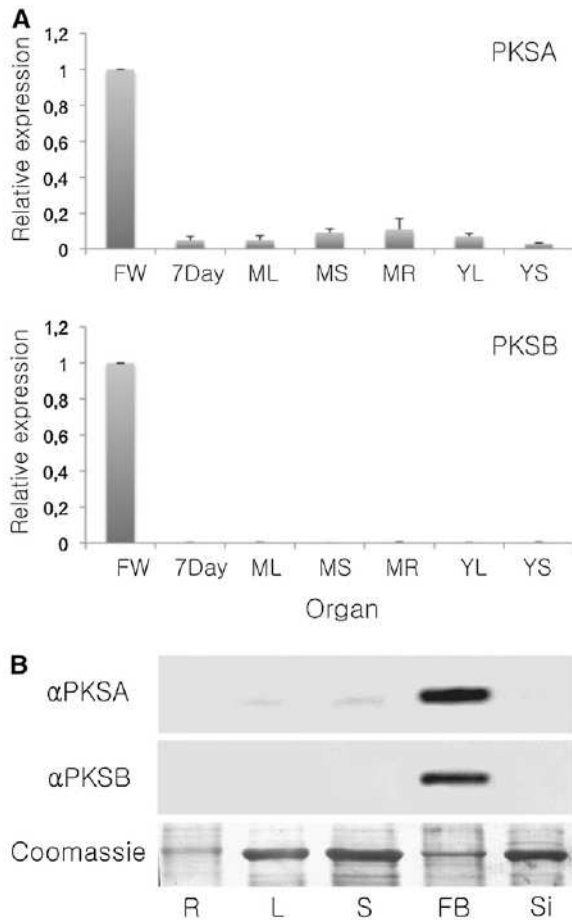


Figure 2. Developmental Expression Profiles of *PKSA* and *PKSB*.

(A) Quantitative RT-PCR analysis of relative *PKSA* and *PKSB* expression levels in various *Arabidopsis* organs. Expression was calculated using the $\Delta\Delta CT$ method and is represented relative to the organ with the highest level of expression (flowers), set at 1.0. *Actin2* was used as a reference gene. Bars represent standard deviations from the means of triplicate determinations. 7 day, 7-d-old seedlings; FW, flower; ML, mature leaf; MR, mature root; MS, mature stem; YL, young leaf; YS, young stem.

(B) Immunoblots of protein extracts from different *Arabidopsis* tissues from mature plants with polyclonal antibodies raised against each recombinant protein. Six micrograms of total protein was loaded in each lane and reacted with antibodies specific to *PKSA* or *PKSB* (α *PKSA* and α *PKSB*). The Coomassie blue-stained loading control is shown below. R, roots; L, leaves; S, stems; FB, flower buds; Si, siliques.

were obtained and compared with those from wild-type plants. Figure 6 and Supplemental Figure 4 online show the results of these analyses. When mature pollen grains were stained with auramine O, profound alterations in exine structure in *pkas-1* and *pkas-2* were revealed by fluorescence microscopy, with the regular reticulate pattern of wild-type exine replaced by irregular and mottled exine patterns in the *pkas-1* and *pkas-2* mutants (Figures 6A to 6C).

Wild-type pollen grain samples prepared for scanning electron microscopy observation, including exposure to a partial vacuum,

displayed a typical round shape with reticulate exine, whereas pollen grains derived from *pkas-1* and *pkas-2* mutant pollen, prepared identically, exhibited collapsed morphology by scanning electron microscopy, indicating that they had weakened pollen walls (Figures 6D to 6I). Higher magnification of scanning electron microscopy images from wild-type and mutant pollen showed that, whereas a conserved exine pattern was present in the mutants, the exine baculae appeared thinner or more diffuse in the mutants relative to the wild type (Figures 6J to 6L). Furthermore, amorphous extrabacular protrusions were observed in the *pkas-2* mutant exine network (Figure 6L). Similar exine morphology was observed in scanning electron microscopy images of pollen from individuals homozygous for additional *pkas* and *pkas* alleles (*pkas-2* and *pkas-1*; see Supplemental Figure 4 online). Finally, transmission electron microscopy (TEM) observations confirmed that the exine of mature pollen grains from *pkas-1* and *pkas-2* mutants was thinner, with shorter baculae and tecta compared with the wild type (Figures 6M to 6O). These results show that *PKSA* and *PKSB* both play specific roles in exine formation during pollen grain development and that each are required for exine and pollen wall integrity and exine patterning.

***PKSA* and *PKSB* Have Partially Redundant Functions in Male Fertility**

Since the *Arabidopsis PKSA* and *PKSB* genes encode PKSs with similar *in vitro* activities (Mizuuchi et al., 2008; Dobritsa et al., 2010), biochemical redundancy between *PKSA* and *PKSB* was a strong possibility. To test this, we generated two independent homozygous double mutants, *pkas-1 pkas-2* and *pkas-1 pkas-3*, identified within F2 populations derived from crossing the corresponding homozygous *pkas* and *pkas* lines. Initial phenotypic examination of *pkas-1 pkas-3* mutant plants (Figure 7) revealed anthers devoid of visible pollen, male sterility, and siliques devoid of seeds. Whereas no visible pollen was ever observed in plants homozygous for the *pkas-1 pkas-3* alleles, *pkas-1 pkas-3* flowers were female fertile when pollinated with wild-type pollen. There were no other obvious morphological differences between the *pkas-1 pkas-3* mutant and wild-type plants grown to maturity (Figure 7).

Within the *pkas-1 pkas-3* F2 population, we identified plants homozygous for *pkas-1* and heterozygous for *pkas-3*. Interestingly, these plants displayed a partially sterile phenotype, with smaller siliques containing fewer seeds or empty siliques. Therefore, we quantified seed set in siliques taken at random from plants with different *PKSA* and *PKSB* allelic combinations (Table 1; $n = 15$ siliques for each genotype). *pkas-1* and *pkas-3* single mutants and plants heterozygous for *pkas-1* and homozygous for *pkas-3* show slightly reduced numbers of seeds relative to wild-type control plants, whereas plants homozygous for *pkas-1* and heterozygous for *pkas-3* showed clear reduction in fertility, with most siliques having 10 or fewer seeds. When placed on the wild-type (Columbia-0 [Col-0]) stigmas, both *pkas-1* and *pkas-2* mutant pollen grains germinated and pollen tubes grew normally (see Supplemental Figure 5 online), suggesting that the fertility differences were not due to defects in pollen germination or pollen tube growth.

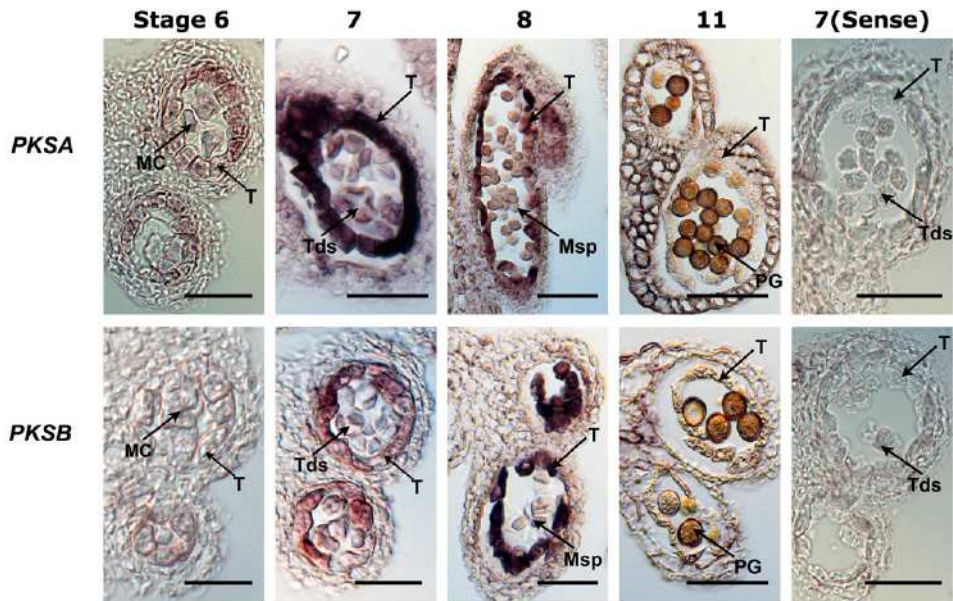


Figure 3. Transient Tapetum-Specific Expression of *PKSA* and *PKSB*.

PKSA and *PKSB* mRNAs were localized by in situ hybridization to sections taken from developing anthers of wild-type (Col-0) flowers using gene-specific antisense probes for *PKSA* and *PKSB* and control sense probes. Stages of anther development are according to Sanders et al. (1999). Dark precipitates indicate hybridization of the probe. MC, meiotic cell; T, tapetum; Tds, tetrads; Msp, microspores; PG, pollen grain. Bars = 70 μ m.

The *pksa-1 pksb-2* double mutant also showed a strong male-sterile phenotype, similar to that of the *pksa-1 pksb-3* double mutant. A few rare pollen grains were obtained from anthers of *pksa-1 pksb-2* double mutant plants. Examination of these pollen grains by scanning electron microscopy revealed that they were severely distorted in shape, with no apparent reticulate exine pattern (see Supplemental Figures 6A to 6C online). After staining with auramine O, fluorescence in the *pksa-1 pksb-2* mutant was attenuated and devoid of a reticulate pattern (see Supplemental Figure 6D online).

Anther and Microspore Development in the *pksa-1 pksb-3* Double Mutant

To determine the point at which pollen development was impaired in the completely male-sterile *pksa-1 pksb-3* double mutant, we examined developing anthers in the double mutant background relative to the wild type by light microscopy (Figure 8), using the stages of anther development defined by Sanders et al. (1999). Microspore and anther development in *pksa-1 pksb-3* plants appeared normal through stage 8, when individual microspores could be seen, indicating that the callose wall had degenerated, releasing microspores from tetrads in a normal manner. However, by stages 9 to 11, aberrant microspore development in *pksa-1 pksb-3* anthers relative to the wild type was observed. Free microspores appeared to have thin walls and aberrant structures, and locules had accumulated debris of defective pollen grains (Figure 8). By stage 12, mature pollen grains were observed in locules of wild-type plants, while most *pksa-1 pksb-3* anthers were devoid of pollen. In a smaller number

of *pksa-1 pksb-3* mutant anthers in stages 9 to 12 (bottom *pksa-1 pksb-3* panels in Figure 8), some pollen grains appeared to be still in the tetrad stage or were fused with each other, and the tapetum layers were highly enlarged and vacuolated and failed to undergo programmed cell death.

We used TEM to examine *pksa-1 pksb-3* microspore development at greater resolution. In agreement with light microscopy observations, at stages 5 to 7, microspore and tapetum development were normal in the mutant, and free microspores were observed at stage 8 (see Supplemental Figure 7 online). However, at stage 9, *pksa-1 pksb-3* microspores had thin cell walls apparently devoid of an exine, and by stage 12, locules were mostly devoid of pollen grains, although occasional defective pollen grains were observed (see Supplemental Figure 7 online).

We next used TEM to examine *pksa-1 pksb-3* mutant anthers and microspores at stages 9 and 11 at greater detail, relative to the wild type. Figure 9 shows that at stage 9, wild-type anthers contained uninucleate microspores with a thick, reticulate exine, intact tapetum, and an electron-dense cuticle on the outer anther epidermis, which exhibited hair-like protrusions (Figures 9A, 9D, 9G, 9J, and 9M). By contrast, aberrant microspore development was observed at the same stage in *pksa-1 pksb-3* anthers (Figures 9B, 9E, and 9K). While uninucleate microspores, an intact tapetum, and a normal anther epidermis with an intact cuticle were present (Figures 9E, 9H, and 9N), microspores were devoid of a recognizable exine (Figure 9E). At higher magnification, a defective, thin fibrillar matrix, presumably defective exine, was apparent on mutant microspores (Figure 9K). At stage 11, most *pksa-1 pksb-3* mutant anthers contained only a few degenerating pollen grains (Figure 8; see Supplemental Figure 7

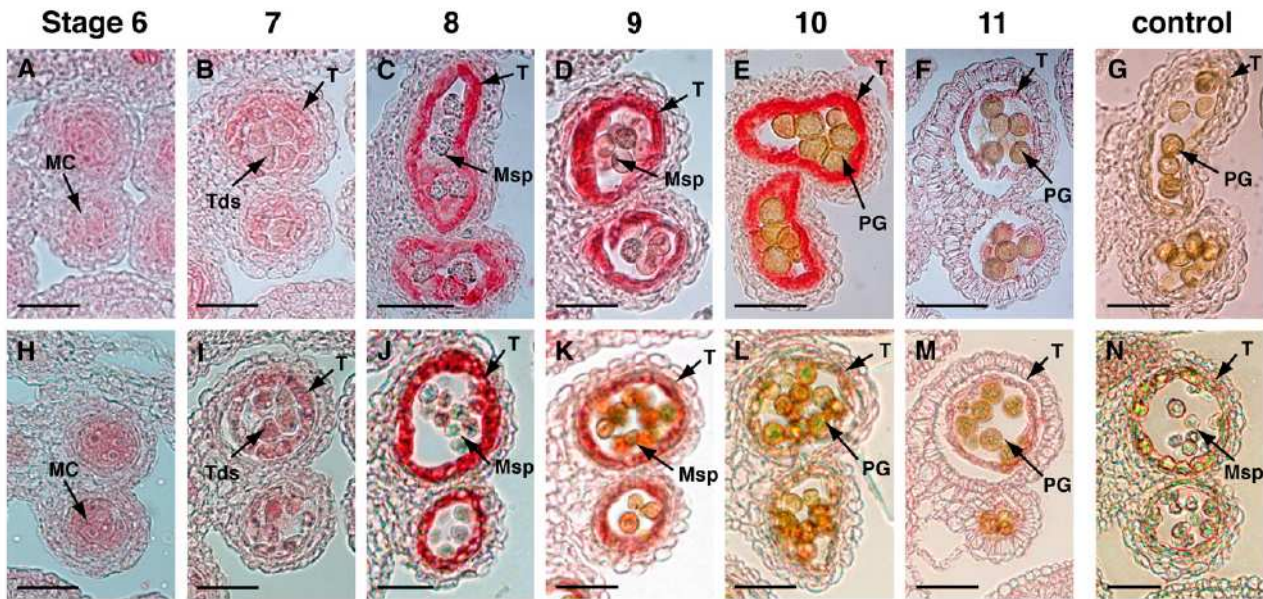


Figure 4. Immunolocalization of PKS Proteins during Anther Development.

Thin sections of flower buds at different stages of development were incubated with specific antibodies raised against each purified recombinant PKS protein. Stages of anther development are indicated above sections according to Sanders et al. (1999). MC, microspore mother cells; Tds, tetrads; T, tapetum; Msp, microspores; PG, pollen grain. Bars = 70 μ m.

(A) to (G) Immunolocalization of PKSA. The protein was detected at stage 7 (B) in tapetum cells surrounding tetrads. Maximum protein accumulation was observed in the tapetum at stages 9 and 10 (D) and (E). A section of *pksa-1* mutant bud at stage 9 is shown as negative control (G).

(H) to (N) Immunolocalization of PKSB. The protein was detected at stage 7 in tapetum cells surrounding tetrads (I). Maximum protein accumulation was observed in the tapetum at stage 8 (J) and then decreased rapidly. A section of *pksb-2* mutant bud at stage 8 was used as negative control (N).

online). However, in a subset of *pksa-1 pksb-3* mutant individuals, enlarged pollen grains were present at this stage (Figure 9C) that had an abnormal exine structure without a thick and reticulated wall (Figures 9F and 9L). Under higher magnification, it was also apparent that the locules of these anthers were filled with misshapen structures and an electron-dense network, possibly unpolymerized sporopollenin precursors (Figures 9I and 9L). In these individuals, the tapetum and anther outer wall epidermis and cuticle appeared to be normal (Figures 9I and 9O).

Enzymatic Activities of Recombinant PKSA and PKSB Proteins

PKS activity of recombinant PKSA and PKSB proteins was assayed in the presence of various fatty acyl-CoA esters as the starter substrates and malonyl-CoA as the extender molecule. We employed 14 C malonyl-CoA as a tracer to visualize radioactive condensation reaction products. Products were fractionated by thin layer chromatography (TLC) after extraction and revealed by exposure to a phosphor imager plate (Figure 10A). When synthetic C16:0-CoA or C18:0-CoA was used as a substrate (Figure 10A, left panel), two major reaction products were detected in incubation mixtures that were identified as the cognate triketide and tetraketide α -pyrone compounds by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis (Figure 11), as previously described by Mizuuchi et al. (2008) but in contrast with Dobritsa et al. (2010), who did not observe

PKSA/B conversion of fatty acyl-CoAs with chain lengths greater than C12. The same reaction products were identified upon incubation with PKSA or PKSB.

To explore the potential sequential actions PKSA/B and ACOS5 enzyme activity in sporopollenin biosynthesis, various additional CoA esters were synthesized enzymatically by incubating recombinant ACOS5 with hydroxylated or unsaturated fatty acids in the presence of ATP and CoA and tested as potential substrates of PKSA and PKSB (Figure 10A, middle and right panels). After a 15-min incubation of ACOS5 in the presence of a given fatty acid, ATP, and CoA as substrates, PKSA or PKSB enzymes and radioactive 14 C malonyl-CoA were added to the reaction medium for a further 1-h incubation. As shown in Figure 10A, radioactive reaction products were detected in all cases, thus demonstrating the promiscuous specificity of PKSA and PKSB. LC-MS/MS analysis revealed that the triketide compound was the predominant product in all incubation mixtures; however, the ratio between tri- and tetraketide α -pyrone reaction products was found to be variable, depending on the nature of the fatty acyl-CoA ester (Figures 10 and 11).

The triketide α -pyrone products resulted from the addition of 4C atoms originating from two rounds of decarboxylative condensation with malonyl-CoA, whereas the tetraketide α -pyrones are built up from the addition of 6C atoms originating from three malonyl-CoA molecules (Figure 10B). Figure 11 illustrates selected examples of the analysis of PKS products by LC-MS/MS. For instance, mass-to-charge (m/z) values of 321 and 363 were

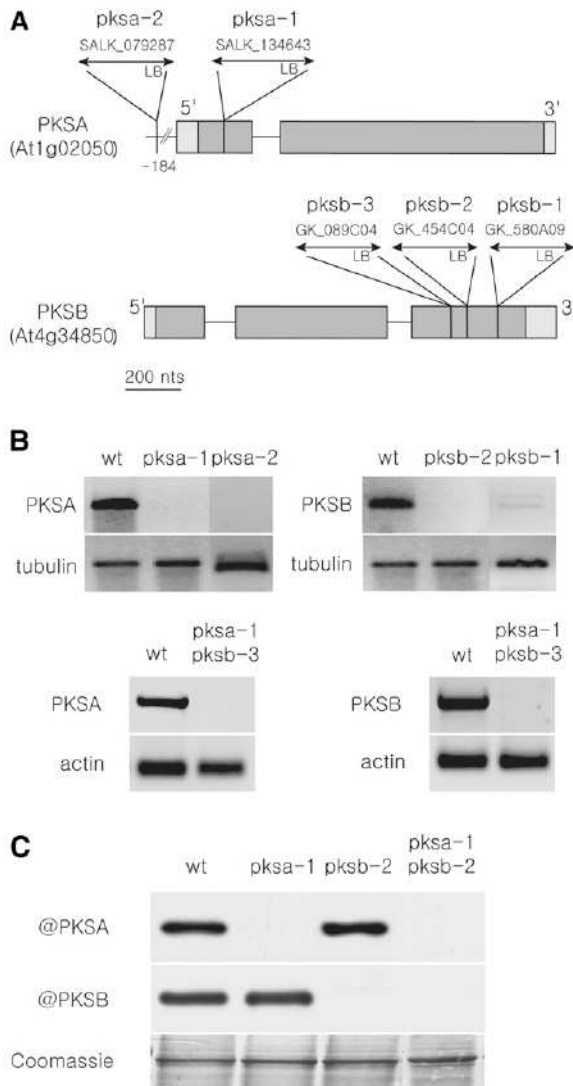


Figure 5. Molecular Characterization of *pksa*, *pksb*, and *pksa pksb* Insertion Alleles and Effects on Gene Expression.

(A) Position of T-DNA insertions in the different mutant lines is shown. Gray boxes denote exons, with lighter gray indicating 5' and 3' untranslated regions. Thin horizontal lines denote introns.

(B) RT-PCR analysis of gene expression in flower buds of wild-type (Col-0) and single and double mutants. No amplicon was detectable in mutant samples. *TUBULIN* and *ACTIN* are shown as positive controls.

(C) Protein accumulation in wild-type (Col-0) and mutant bud extracts was evaluated by immunoblotting with specific antibodies as indicated. The Coomassie blue-stained loading control is shown below. No protein accumulation was detected in mutant lines, thus confirming that gene expression was knocked out in *pksa-1*, *pksb-2*, and *pksa-1 pksb-2* lines. Ten micrograms of protein was loaded in each lane.

found for tri- and tetraketide products, respectively, from C16:0-CoA incubation, and 349 and 391 *m/z* values were measured for C18:0-CoA extension products (Figure 11A). Fragmentation patterns of tri- and tetraketide α -pyrones synthesized with C17-CoA as a substrate were obtained by collision-induced dissociation

of $[M-H]^-$ ions (Figures 11B and 11C) and were characteristic of α -pyrone derivatives (Saxena et al., 2003; Funa et al., 2006). It is noteworthy that, for a given substrate, the relative amounts of reaction products varied from one enzyme preparation to another, with the tri- to tetraketide α -pyrone ratio being inversely correlated with the level of activity of the enzyme preparation. These observations suggest that the triketide α -pyrone likely represents a derailment reaction product, with poorly active enzymes becoming unable to perform the third round of condensation to malonyl-CoA that is required to build up the tetraketide α -pyrones.

When unsaturated or hydroxylated fatty acids were first incubated with ACOS5 to synthesize the cognate fatty acyl-CoA esters, all the resulting CoA esters proved to be substrates for PKS since, in all cases, the corresponding tri- and tetraketide compounds were found in the incubation medium (Figure 11D). These results suggest that tapetum-localized PKSA and PKSB enzymes use ACOS5-derived fatty acyl-CoA esters as starter substrates for the biosynthesis of triketide and tetraketide α -pyrones and that such polyketides play an essential role in generating a robust, structurally sound sporopollenin polymer during exine deposition in developing microspores.

Substrate Preference and Steady State Kinetics of PKSA

In light of the proposed involvement of hydroxy fatty acyl-CoA esters as precursors for sporopollenin biosynthesis (Morant et al., 2007; de Azevedo Souza et al., 2009; Dobritsa et al., 2009) and the ability of PKSA and PKSB to use these as substrates for generation of tri- and tetraketide α -pyrones (Figures 10 and 11), we used competition assays and enzyme kinetics to test PKSA preference for such substrates relative to unsubstituted fatty acyl-CoAs. Figure 12 shows the results of substrate competition assays using selected synthetic hydroxy fatty acyl-CoA esters (16-OH-C16-CoA and 12-OH-C18-CoA), which clearly demonstrated PKSA *in vitro* preference for hydroxy fatty acyl-CoA esters. When 16-OH-C16-CoA at 30 μ M and C16-CoA at 100 μ M were coincubated with PKSA, the production of 15-OH-C15- α -pyrone was reduced to 76% of the control level without competitor (Figure 12, lanes 2 and 4), while the production of C15- α -pyrone was reduced to 12% of the control level (Figure 12, lanes 3 and 4). Substrate preference was more drastic in the pair of 12-OH-C18-CoA and C18-CoA. Whereas C18-CoA at 100 μ M reduced the production of 17-OH-C17- α -pyrone to 67% of the control level (Figure 12, lanes 5 and 7), 12-OH-C18-CoA at 30 μ M almost completely inhibited the production of C17- α -pyrone (Figure 12, lanes 6 and 7), suggesting very strong preference of PKSA for 12-OH-C18-CoA relative to C18-CoA.

To investigate further PKSA *in vitro* substrate preference for hydroxy fatty acyl-CoA esters, we used purified recombinant PKSA for steady state enzyme kinetic analysis and determined the parameters shown in Table 2. The apparent K_m and k_{cat} values of PKSA for 16-OH-C16-CoA and 12-OH-C18-CoA were 25 μ M and $2.8 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, and 23 μ M and $5.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, respectively, whereas the corresponding values for C16-CoA were 48 μ M and $0.13 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Thus, the calculated values for the catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) for 16-OH-C16-CoA and 12-OH-C18-CoA (110 and 220 $\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectively) are 40- to 80-fold higher than the corresponding value for C16-CoA ($2.7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

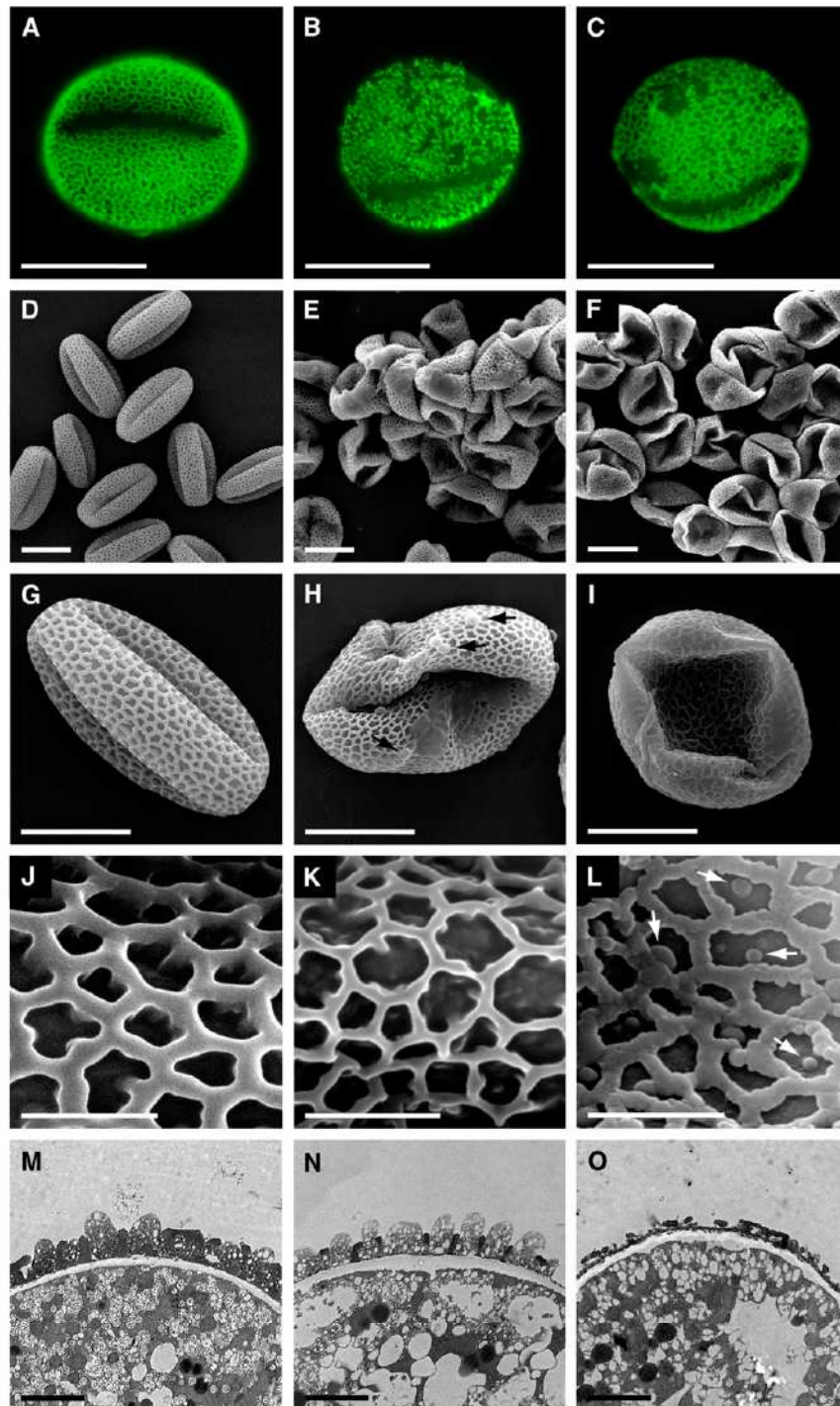


Figure 6. Exine Defects in Pollen Grains of Single *pksa-1* or *pksb-2* Mutants.

Pollen grains from mature wild-type (Col-0) plants ([A], [D], [G], [J], and [M]) and plants homozygous for the *pksa-1* ([B], [E], [H], [K], and [N]) and *pksb-2* ([C], [F], [I], [L], and [O]) alleles were analyzed by auramine O staining, scanning electron microscopy, and TEM. Bars = 10 μm in (A) to (I), 2 μm in (J) to (L), and 1 μm in (M) to (O). Arrows in (H) indicate defective exine patterning and in (L) indicate globular protrusions observed in the *pksb-2* mutant.

(A) to (C) Auramine O staining of Col-0, *pksa-1*, and *pksb-2* pollen, respectively.

(D) to (L) Scanning electron microscopy images of pollen samples at three magnification values.

(M) to (O) TEM images of Col-0, *pksa-1*, and *pksb-2* pollen grains, respectively.

[See online article for color version of this figure.]

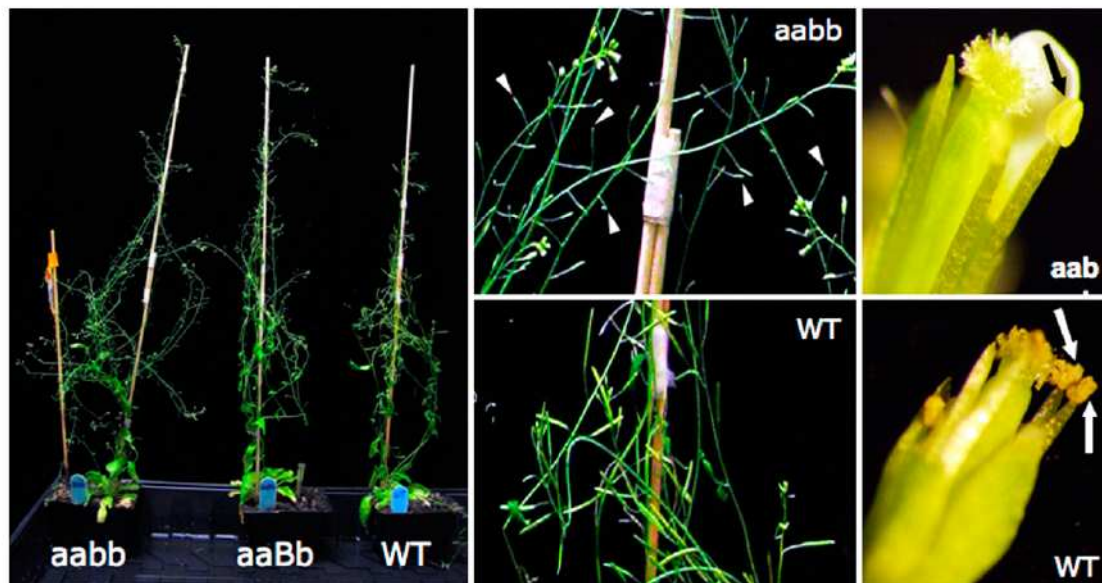


Figure 7. Phenotypic Characterization of Plants Segregating for *pksa* and *pksb* Alleles.

Plants homozygous for *pksa-1* and *pksb-3* alleles were crossed, and an F1 individual self-pollinated to generate a population segregating for *pksa-1* and *pksb-3* alleles. Plants were subjected to PCR-aided genotyping and grown to maturity. *PKSA* alleles are symbolized by A (WT) and a (*pksa-1*), and *PKSB* alleles are symbolized by B (WT) and b (*pksb-3*). Phenotypes of mature aabb, aaBb, and AABb (WT) plants are shown. Double mutant plants (aabb) had no pollen in anthers (black arrow) and undeveloped siliques (arrowheads), resulting in a complete absence of seeds, whereas Col-0 anthers had abundant pollen at this stage (white arrows). However, there are no other obvious morphological differences except that they flowered for a longer time. [See online article for color version of this figure.]

These results show that hydroxy fatty acyl-CoA esters such as those preferentially generated by ACOS5 are the preferred in vitro substrates of PKSA and suggest that such substrates are likely the preferred in planta substrates.

PKSA and PKSB Proteins Localize to the ER

To investigate the cellular localization of PKSA and PKSB proteins, 5' translational fusions to enhanced green fluorescent protein (eGFP) under the control of the cauliflower mosaic virus 35S promoter (p35S:PKSA/B-eGFP) were generated. The constructs were transiently expressed in *Nicotiana benthamiana*

leaves, together with a reporter construct of an ER marker (monomeric red fluorescent protein [mRFP]-HDEL). As shown in Figures 13A and 13C, PKSA/B-eGFP displayed a reticulate expression pattern in epidermal cells. Figures 13B and 13D show that this pattern coincides with that of mRFP-HDEL, which is typical of ER localization. These data indicate that PKSA and PKSB enzymes are associated to the ER.

DISCUSSION

Lipophilic polyesters such as cutin, suberin, and sporopollenin often are present at plant surfaces, provide protection from biotic

Table 1. Quantification of Seed Set in Plants with Different *PKSA* and *PKSB* Allelic Combinations

Genotype ^a	No. of Siliques Containing the Given Numbers of Seeds								
	>71 ^b	70–61	60–51	50–41	40–31	30–21	20–11	10–1	0
AABB	6.0	9.0	0	0	0	0	0	0	0
AAbb	4.3	8.3	2.3	0	0	0	0	0	0
Aabb	3.7	10.3	1.0	0	0	0	0	0	0
AaBb	5.3	9.7	0	0	0	0	0	0	0
aaBB	1.0	10.0	4.0	0	0	0	0	0	0
aaBb	0	0	0	0	0.7	0.7	2.7	10.0	1.0
aabb	0	0	0	0	0	0	0	0	15.0

^aAt1g02050 (*PKSA*) alleles are symbolized by A (WT) and a (*pksa-1*), and At4g34850 (*PKSB*) alleles are symbolized by B (WT) and b (*pksb-3*).

^bValues represent the average number of siliques on one branch from the indicated genotype that contain seeds numbering within the given range. Genotype AABB (wild type) contained at least 61 seeds in each silique. On the other hand, genotype aabb (double mutant *pksa-1 pksb-3*) had no seeds in any siliques. Genotype aaBb showed clearly reduced fertility with most siliques having 10 or fewer seeds.

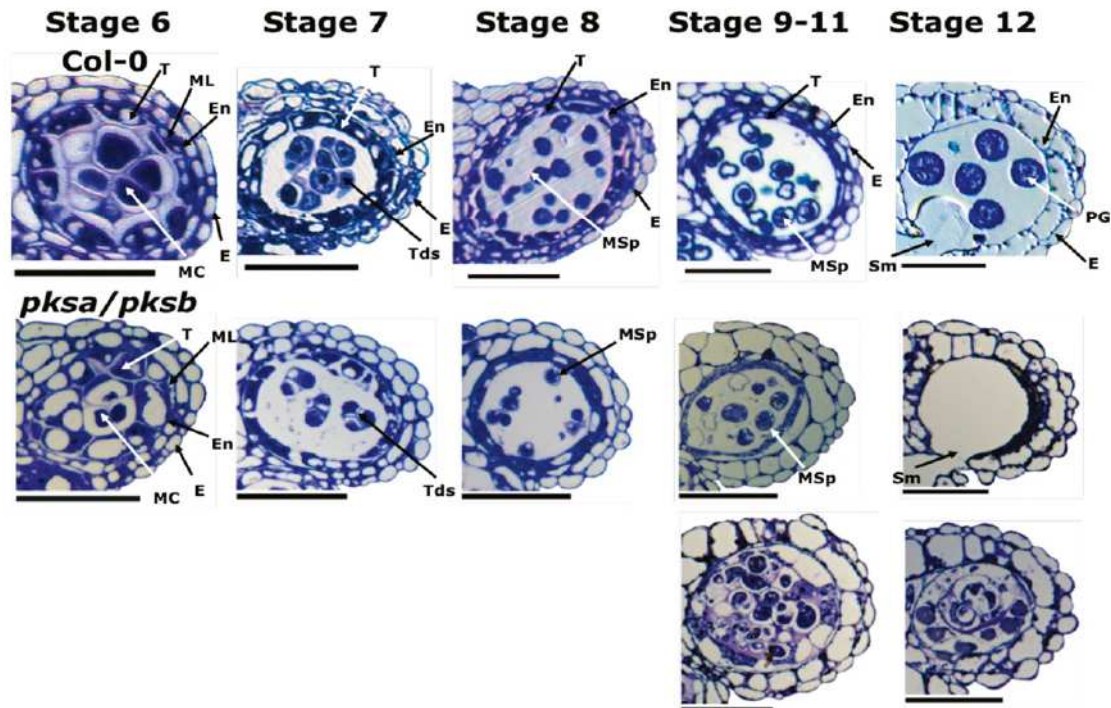


Figure 8. Phenotypic Characterization of Anther and Microspore Development in Wild-Type (Col-0) and *pksa-1 pksb-3* Flowers.

Anther cross sections (1 μm) were taken from developing flowers of wild-type plants and *pksa pksb* mutant plants and stained with toluidine blue. Numbers indicate anther developmental stages according to Sanders et al. (1999). The two panels at the bottom illustrate anther phenotypes at stages 9 to 12 occasionally found in *pksa pksb* mutants. De, debris of defective pollen grains; E, epidermis; En, endothecium; MC, meiotic cell; ML, middle layer; MSp, microspores; PG, pollen grains; Sm, septum; T, tapetum; Td; tetrad. Bars =40 μm .

and abiotic environmental factors, and are thought to have evolved early during colonization of land by plants (Pichersky and Gang, 2000; Bowman et al., 2007; Franke and Schreiber, 2007). Whereas the composition of cutin and suberin and their biosynthetic origins are relatively well characterized (Franke and Schreiber, 2007; Pollard et al., 2008), sporopollenin is poorly understood due to its heavily cross-linked nature, resistance to chemical degradation, and small amounts of biological material (Scott et al., 2004). In this article, we show that two *Arabidopsis* type III PKSs, PKSA and PKSB, that are related to CHS play essential roles in exine formation and sporopollenin biosynthesis during the free microspore phase of pollen development. Our data show that PKSA and PKSB are promiscuous in the substrates they accept but that these substrates include hydroxy fatty acyl-CoA products generated by anther-specific cytochrome P450s and ACOS5, key enzymes required for exine formation proposed to play roles early in a hypothetical sporopollenin precursor biosynthetic pathway (Morant et al., 2007; de Azevedo Souza et al., 2009; Dobritsa et al., 2009). The strong preference of PKSA for hydroxy fatty acyl-CoAs generated by anther-specific cytochrome P450s and ACOS5 suggests that these are used by the anther-specific PKSs PKSA and PKSB to generate polyketides that are required for sporopollenin biosynthesis. This adds a new function for this class of natural products that exhibit an amazing functional diversity. The tight and tran-

sient coexpression of ACOS5 (de Azevedo Souza et al., 2009), PKSA, and PKSB (Figure 3) in tapetum cells at the uninucleate free microspore stages of anther development, coupled with the localization of PKSA and PKSB enzymes to the tapetum at these stages (Figure 4), suggest tapetum localization of a polyketide biosynthetic pathway involving the sequential actions of ACOS5 and PKSA/PKSB, consistent with the hypothesized secretion of sporopollenin precursors from the tapetum into locules prior to their polymerization into the exine of developing free microspores (Bedinger, 1992).

PKSA and PKSB Are Specifically Required for Sporopollenin Biosynthesis

Recently, Dobritsa et al. (2010) showed that *LAP5/PKSB* and *LAP6/PKSA* are required for exine formation and male fertility, since *lap5/pksa* and *lap6/pksb* mutants are defective in exine patterning and a *lap5/pksa lap6/pksb* double mutant is male sterile, lacks pollen at anther maturity, and exhibits defective exine formation in developing microspores. In our work, we observed similar defects in exine formation in single and double mutants and complete loss of fertility in the double mutant. However, we also observed decreases in fertility of single mutants (Table 1), suggesting that relatively subtle defective exine phenotypes (Dobritsa et al., 2010; Figure 6) impact pollen function.

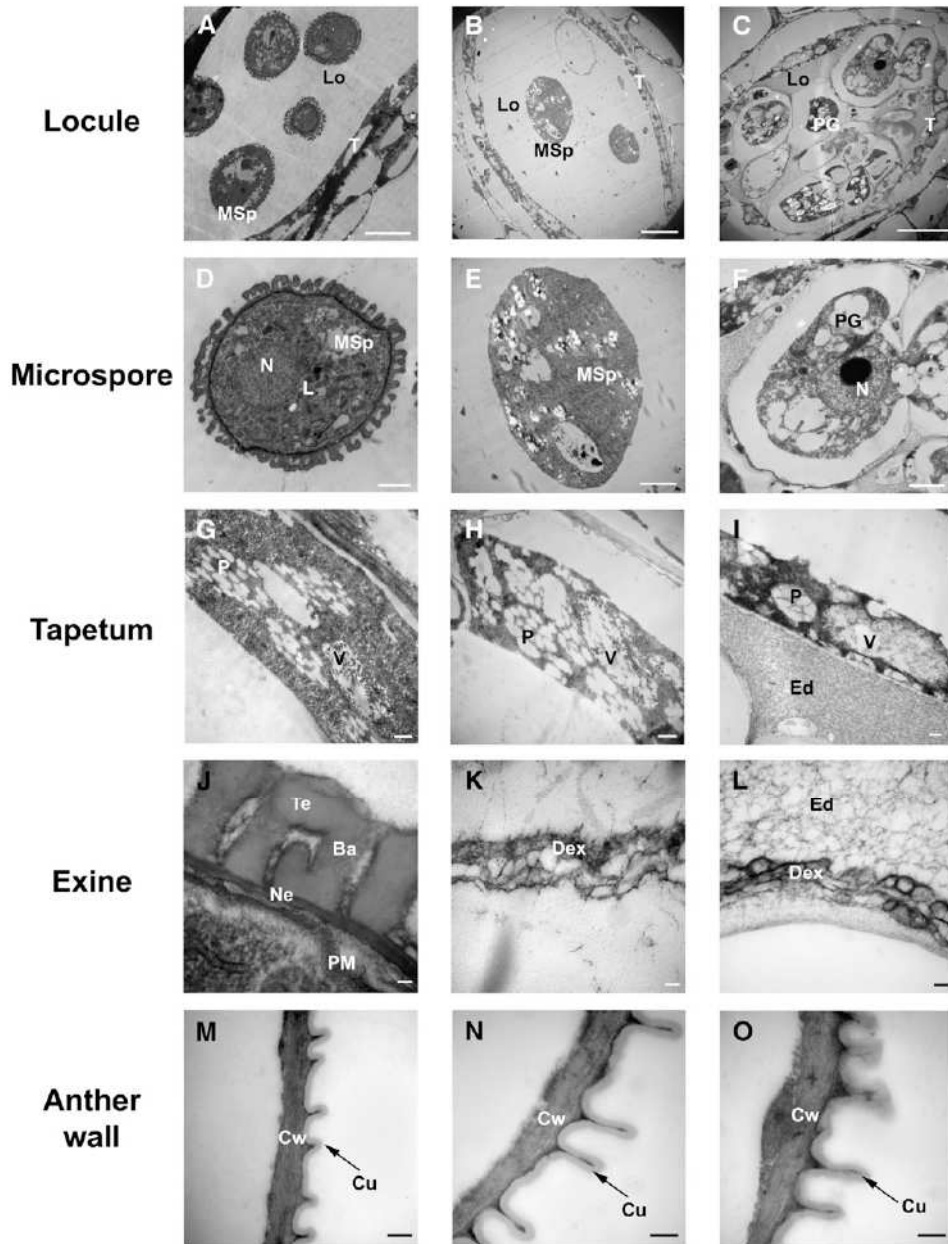


Figure 9. Transmission Electron Micrographs of Wild-Type (Col-0) and *pksa-1 pksb-3* Anthers and Pollen.

(A), (D), (G), (J), and (M) Microspore structure, tapetum structure, exine formation, and outer wall of anther epidermis at anther stage 9 in Col-0 wild-type plants.

(B), (E), (H), (K), and (N) Microspore structure, tapetum structure, exine formation, and outer wall of anther epidermis at anther stage 9 in *pksa-1 pksb-3* plants.

(C), (F), (I), (L), and (O) Pollen grain structure, tapetum structure, exine formation, and outer wall of anther epidermis at anther stage 11 in *pksa-1 pksb-3* plants.

Ba, bacula; Cu, cuticle; Cw, cell wall; Dex, defective exine structure; Ed, electron-dense material; Ex, exine; L, lipid body; Lo, locule; MSp, microspore; N, nucleus; Ne, nexine; P, plastid filled with plastoglobuli; PG, pollen grain; PM, plasma membrane; T, tapetal cell; Te, tectum; V, vacuole containing electron-dense material. Bars = 10 μ m in **(A)** to **(C)**, 2 μ m in **(D)** to **(F)**, 500 nm in **(G)** to **(I)** and **(M)** to **(O)**, and 100 nm in **(J)** to **(L)**.

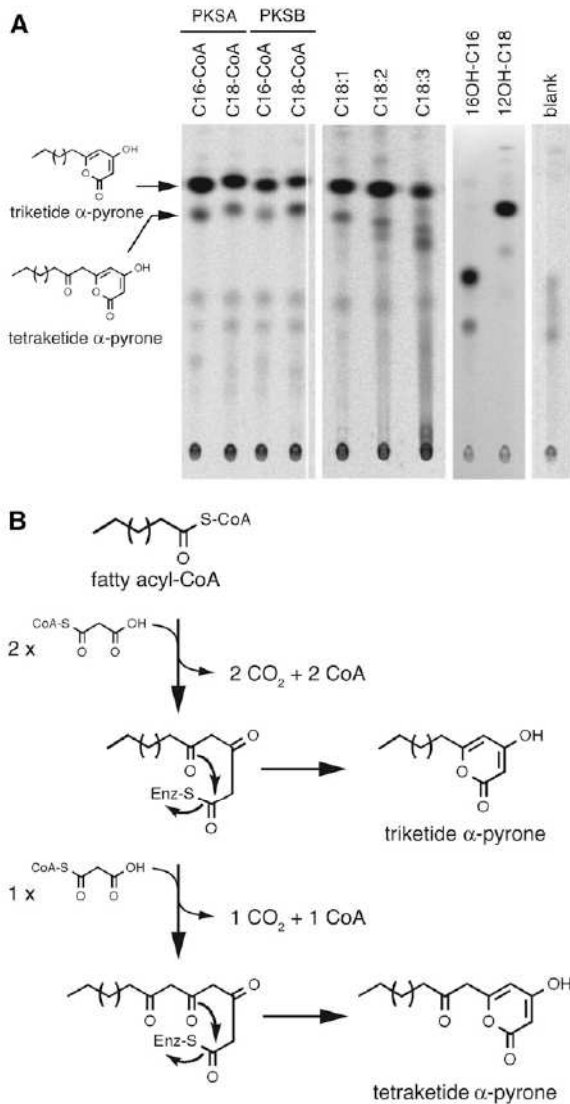


Figure 10. TLC Analysis of Radiolabeled Reaction Products of PKSA.

Recombinant proteins produced by bacteria were incubated with different CoA esters as starters and ^{14}C -malonyl-CoA as extender. Radioactive reaction products were separated by TLC and detected using a phosphor imager.

(A) Left panel: Chemically synthesized CoA esters used as starters are indicated above each lane. PKSA or PKSB was incubated as indicated. The structures of the major reaction products as deduced from LC-MS/MS analysis are shown on the left. Middle panel: The CoA esters synthesized after incubation of ACOS5 with unsaturated fatty acids as substrates were incubated with PKSB and malonyl-CoA. Tri- and tetraketide reaction products were identified by LC-MS/MS. Right panel: After incubation of 16-OH palmitic or 12-OH stearic acids in the presence of ACOS5, the resulting esters were condensed with malonyl-CoA by PKSB, yielding corresponding tri- and tetraketide α -pyrones. Blank was run without addition of fatty acyl-CoA. No products were observed without addition of PKSA or PKSB.

(B) Putative mechanism of fatty acyl-CoA condensation with malonyl-CoA catalyzed by PKSA or PKSB. After two rounds of extension with malonyl-CoA, the intermediate compounds may form a cyclic lactone, yielding

Our detailed phenotypic analysis of the double mutant revealed new features of its loss-of-function phenotype, providing insights into functions of the wild-type enzymes. In the majority of anthers observed, defective microspore development was first observed at stage 9 (Figure 8), consistent with the timing of transient PKSA and PKSB expression (Figure 3) and protein accumulation (Figure 4) in the tapetum and the timing of exine formation (Blackmore et al., 2007). High-resolution TEM images of stage 9 wild-type and double mutant anthers (Figure 9) showed that mutant microspores completely lacked exine, which was replaced by an amorphous material similar to that we observed in other mutants defective in sporopollenin biosynthesis (*acos5*, *abcg26*, and *drl1/tkpr1*; de Azevedo Souza et al., 2009; Grienberger et al., 2010; Quilichini et al., 2010). No abnormalities in tapetum cells were observed, and anther epidermal wall cutin deposition was similar to that in wild-type plants. Thus, the *pksa pksb* defect appears to be highly specific to exine formation and sporopollenin biosynthesis, consistent with PKSA and PKSB tapetum-specific expression patterns. Thus, unlike the fatty acid hydroxylase CYP704B1, which is involved in generating both sporopollenin and cutin precursors in developing rice anthers (Li et al., 2010), PKSA and PKSB appear to be specific in generating polyketide sporopollenin constituents.

In some of the *pksa pksb* mutant anthers, additional more complex microspore and locule phenotypes were observed at stage 9 and later stages. The presence of aberrant microspores showing signs of developmental arrest and cell fusion suggests that lack of PKSA/PKSB-derived polyketide sporopollenin constituents affects cell surface properties of developing microspores at the tetrad and subsequent stages. The densely staining material found in the locules of such *pksa pksb* mutant anthers (Figure 8, stages 9 to 11, and Figures 9I and 9L, electron-dense material) was not observed in wild-type anthers and could represent high levels of unpolymerized fatty acid alkylpyrone polyketide precursors and/or material that normally copolymerizes with such polyketide sporopollenin constituents to form the exine. Abnormal accumulation of such potentially lipophilic material could also result in the abnormal microspore cellular structure and apparent cell fusions observed in these anthers, and the complex phenotype of the double mutant could explain the extensive changes in the anther metabolome observed in *lap5/pksa lap6/pksb* mutants (Dobritsa et al., 2010). Taken together, our results indicate an essential function for PKSA- and PKSB-derived polyketide products in sporopollenin biosynthesis and microspore development.

Different in Vivo Functions of PKSA and PKSB

Both PKSA and PKSB recombinant enzymes catalyzed the decarboxylative condensations of fatty acyl-CoAs with malonyl-CoA in vitro to generate tri- and tetraketide α -pyrones (Figures 10 and 11). Single mutants affected in either PK gene displayed subtle changes in exine patterning and deposition (Figure 6)

triketide α -pyrones, or undergo an additional round of extension yielding the tetraketide α -pyrone compounds.

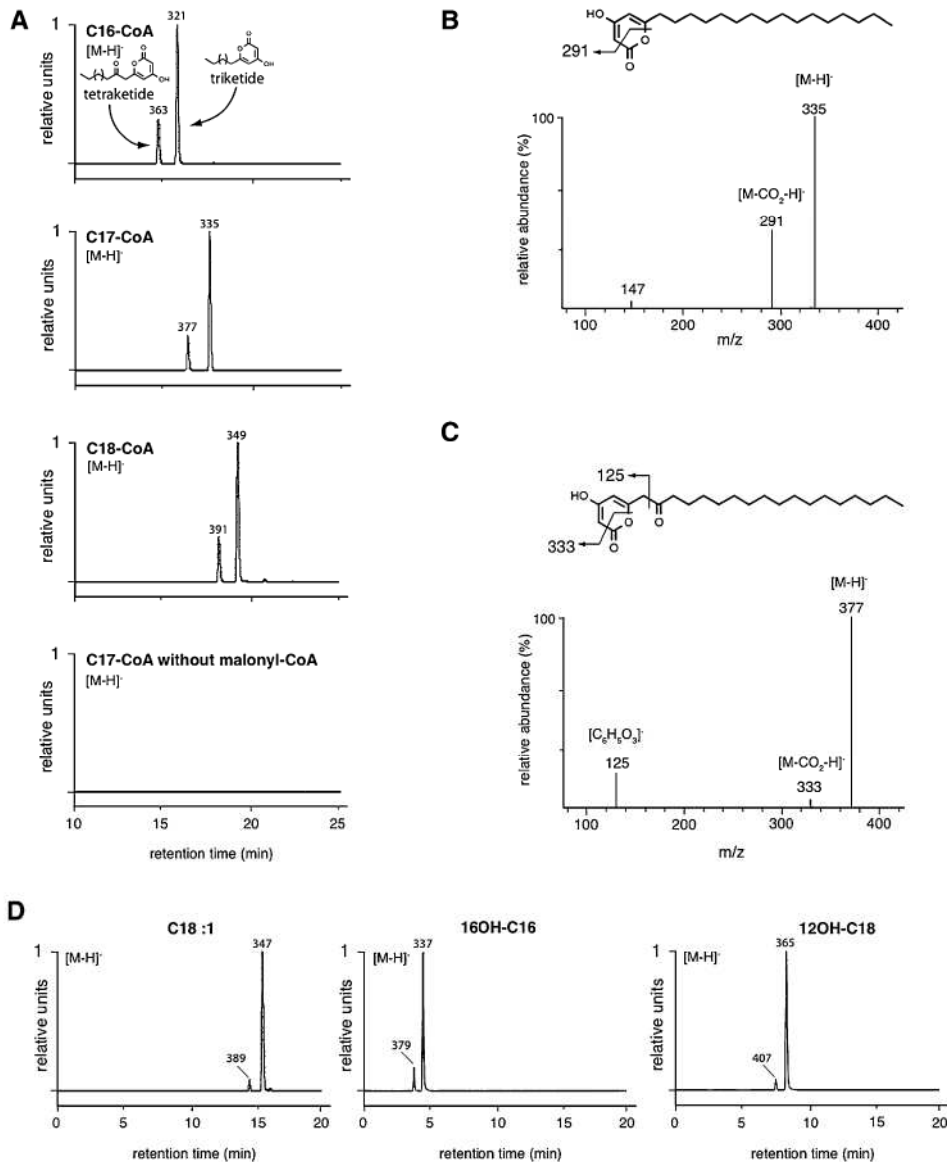


Figure 11. Identification of PKS Reaction Products by LC-MS/MS.

Reaction products were resolved by reverse-phase UPLC and analyzed by MS/MS. Negative electrospray ionization was used, and [M-H]⁻ ions were detected by *m/z* values as indicated.

(A) C16-CoA, C17-CoA, or C18-CoA was used as starter substrate as indicated, and cognate tri- and tetraketide reaction products were detected. The *m/z* value of [M-H]⁻ ion of each product is indicated. A negative control incubated without malonyl-CoA is shown at the bottom.

(B) Fragmentation pattern of the [M-H]⁻ ion of the triketide α -pyrone obtained with C17-CoA as substrate. Structure of the compound and putative fragmentation scheme are shown above.

(C) Fragmentation pattern of the [M-H]⁻ ion of the tetraketide α -pyrone reaction product from C17-CoA incubation. Structure of the molecule and its putative fragmentation are shown.

(D) Tri- and tetraketide α -pyrone reaction products were characterized by their *m/z* values after incubation of the unsaturated or hydroxylated fatty acid indicated above the profile with ACOS5 and PKS enzymes (see Methods). The major peaks correspond to triketide products and the minor ones to tetraketide products.

but were fertile. By contrast, the *pksa pksb* double mutant produced very small amounts of pollen and was completely male sterile (Figures 7 and 8), consistent with the observations of Dobritsa et al. (2010). Whereas these data suggest that they have partially redundant functions in exine formation, we

present several lines of evidence suggesting that PKSA and PKSB could fulfill different *in vivo* functions. First, exine patterning defects in the *pksa* and *pksb* mutants were slightly different, with *pksb* mutants showing more pronounced defects, including ectopic globular exine protrusions (Figure 6). Second, results

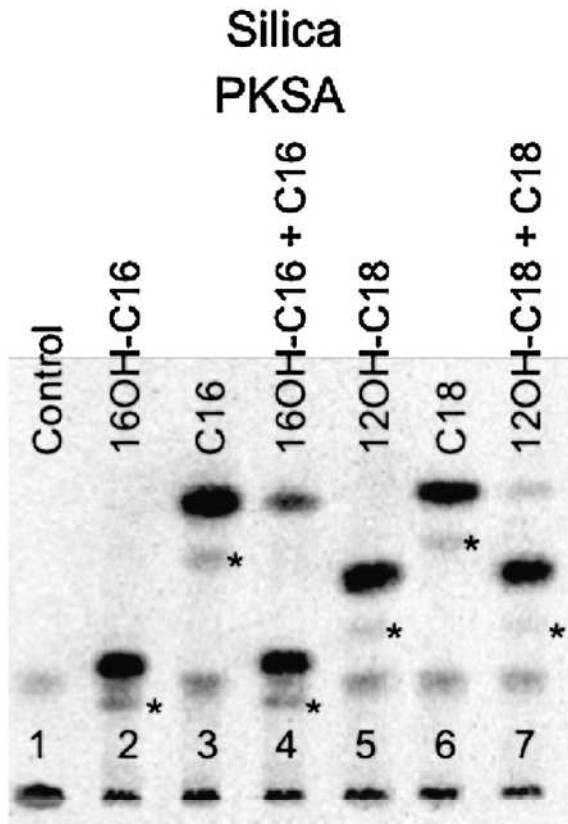


Figure 12. Radio Silica-TLC of Substrate Competition Assay for PKSA.

A PKSA reaction mixture containing 50 μM [$2\text{-}^{14}\text{C}$] malonyl-CoA was supplemented with 16-OH-C16-CoA (30 μM , lane 2), C16-CoA (100 μM , lane 3), or both 16-OH-C16-CoA (30 μM) and C16-CoA (100 μM) (lane 4). Similarly, the PKSA reaction was performed in the presence of 12-OH-C18-CoA at 30 μM (lane 5), C18-CoA at 100 μM (lane 6), or both 12-OH-C18-CoA and C18-CoA at 30 and 100 μM , respectively (lane 7). Each reaction produced a triketide α -pyrone as the major product and a tetraketide pyrone (denoted with an asterisk) as the minor product. To assay competition, α -pyrone product levels in lane 4 were compared with those in lanes 2 and 3 (no competitors added) and those in lanes 7 to those in lanes 5 and 6 (no competitor added). In the control lane (1) [$2\text{-}^{14}\text{C}$] malonyl-CoA was incubated with PKSA in the absence of fatty acyl-CoA.

from quantification of seed set in siliques of plants with different PKSA and PKSB allelic combinations (Table 1) showed that partial addition of PKSA activity to the *pkSB pkSB* background in PKSA *pkSA pkSB pkSB* plants partially restored fertility relative to fully sterile *pkSA pkSA pkSB pkSB* plants, whereas addition of PKSB activity to *pkSA pkSA pkSB pkSB* plants (*pkSA pkSA PKSB pkSB* plants) did not have this effect (Table 1). One interpretation of these data is that PKSA plays a more critical role in exine formation than does PKSB.

PKSA and PKSB expression and protein accumulation patterns support differentiated *in vivo* roles of the two enzymes. In this respect, microarray analyses comparing gene expression in *Arabidopsis* wild-type anthers relative to that in *sporocyteless/nozzle* or *excess microsporocytes1/extrasporogenous cells mu-*

tants suggest that SPL and/or EMS1 positively regulate transcription of *ACOS5*, *PKSA*, and *CHSL2* (*At4g00040*), all of which showing highly decreased expression levels in the *spl/nzz* and *ems1/exs* mutants (Wijeratne et al., 2007). By contrast, expression of *PKSB* was unaffected in the mutant backgrounds (Wijeratne et al., 2007). Our results show that the timing of maximal tapetum-localized PKSA and PKSB mRNA accumulation differs over the course of anther development (Figure 3), further supporting distinct regulatory control and potential specialized functions of the two genes.

Results from immunolocalization of PKSA and PKSB proteins in the tapetum over the course of anther development indicate a pattern of PKSB accumulation that is distinct from that of PKSA. PKSB shows an earlier and more transient tapetum-localized accumulation pattern during microsporogenesis (Figure 4; see Supplemental Figure 1 online). The transient pattern of PKSB protein accumulation (Figure 4) closely mirrored the timing of transient PKSB mRNA accumulation in tapetum cells at stage 8 (Figure 3) and is indicative of rapid protein turnover in tapetum cells after this stage. This was not the case for PKSA, which showed an early, transient pattern of mRNA accumulation followed by a broad period of protein accumulation. This suggests that PKSA protein turns over at a slower rate than does PKSB in later stages of anther development, consistent with a differential role later in microspore development.

At stage 8 of anther development, following release of individual microspores from tetrads, the first exine constituents produced in the sporophytic tapetum cell layer are deposited on the primexine microspore surface (Piffanelli et al., 1998; Suzuki et al., 2008). The rapid, transient burst of PKSB expression and protein accumulation at this stage suggests that the polyketide generated by PKSB may be essential at an early step of exine formation, possibly for initiating reticulated exine patterning, in cooperation with polyketides generated by PKSA. The ectopic accumulation of globular exine protrusions outside of recognizable baculae, observed in *pkSB* but not *pkSA* mutants (Figure 6), is consistent with a specific function for PKSB-generated polyketides in the early stages of sporopollenin deposition, when exine patterning is initiated.

It is noteworthy that another *Arabidopsis* PKS gene, *CHSL2* (*At4g00040*), is 79% similar to PKSA. However, when expressed in bacteria, the cognate recombinant protein displayed no activity (formation of polyketide products) with the same fatty acyl-CoA and malonyl-CoA substrates used by PKSA and PKB (data not shown). These results, together with expression data from public databases showing that *CHSL2* is expressed at later stages of flower bud development, indicate that CHSL2 performs an unknown enzymatic function distinct from that of PKSA.

Table 2. The Steady State Kinetic Parameters of Recombinant PKSA

Substrate	K_m (μM) ^a	k_{cat} (10^{-3} s^{-1}) ^a	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) ^a
16-OH-C16-CoA	25 \pm 5.0	2.8 \pm 0.59	112
12-OH-C18-CoA	23 \pm 3.8	5.0 \pm 1.1	217
C16-CoA	48 \pm 3.2	0.13 \pm 0.43	2.7

^aValues given are means \pm SD; $n = 3$.

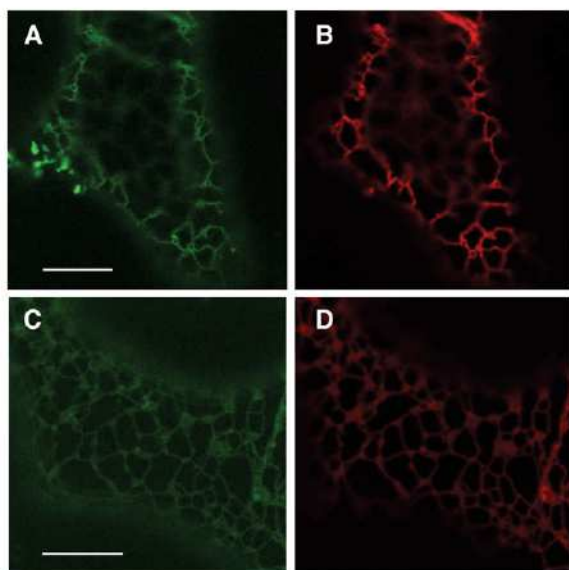


Figure 13. Subcellular Localization of PKSA and PKSB.

PKSA- and PKSB-eGFP and mRFP-HDEL (ER marker protein) constructs were transiently expressed in *N. benthamiana* leaves by coagrobacter transformation. Bars = 10 μ m.

(A) PKSA-eGFP expression.

(B) mRFP-HDEL coexpression coincides with PKSA-eGFP expression.

(C) PKSB-eGFP expression.

(D) mRFP-HDEL coexpression coincides with PKSB-eGFP expression.

Biochemical Functions of PKSA and PKSB

Type III PKSs produce secondary metabolites that play a variety of roles in plants. Our study, together with the recent report of Mizuuchi et al. (2008), shows that both PKSA and PKSB produce triketide and tetraketide α -pyrones by condensation with long-chain fatty acyl-CoAs (up to 20-carbon chain length) and malonyl-CoA. The two PKSs have unusually broad substrate specificities and a different cyclization strategy compared with typical plant type III PKSs (Mizuuchi et al., 2008). In contrast with our results and those of Mizuuchi et al. (2008), Dobritsa et al. (2010) failed to observe activity of recombinant LAP5/PKSA or LAP6/PKSB against fatty acyl substrates greater than C12 in length. The reason for this discrepancy is not clear, but activity against C16 to C18 fatty acyl-CoA substrates was consistently observed in multiple assays using our recombinant enzyme preparations (Figures 10 to 12, Table 2).

Our work also shows that, *in vitro*, PKSA preferentially catalyzes condensation of hydroxy fatty acyl-CoAs, which may be sequentially generated by CYP703A2 (Morant et al., 2007) and/or CYP704B1 (Dobritsa et al., 2009) with ACOS5 (de Azevedo Souza et al., 2009) to produce corresponding hydroxy tri- and tetraketide α -pyrones (Figures 10 and 11). Since ACOS5 also accepts a broad range of fatty acid substrates (de Azevedo Souza et al., 2009), the exact nature of its *in vivo* products that could be used as potential *in vivo* PKSA and PKSB substrates remains unclear. However, ACOS5 shows highest activity against medium-chain hydroxylated fatty acids (de Azevedo

Souza et al., 2009) and could thus generate medium-chain hydroxy fatty acyl-CoAs, for which PKSA has a strong substrate preference. Thus, an attractive hypothesis is that the hydroxylated acyl chains generated by ACOS5 and a suite of cytochrome P450 hydroxylases (Morant et al., 2007; de Azevedo Souza et al., 2009; Dobritsa et al., 2009; Li et al., 2010) are incorporated into multihydroxy tri- and tetraketide α -pyrones products *in vivo*. The preferential subcellular localization of PKSA and PKSB to the ER (Figure 13) supports this model. Since the P450 hydroxylases are likely ER localized, they may form metabolons with the ER-associated PKSs to form alkyl- α -pyrones. Consistent with this, the TKPR1 enzyme that appears to act downstream of PKSA and PKSB is also ER localized (Grienenberger et al., 2010), suggesting the presence of an ER-localized pathway for alkyl- α -pyrone sporopollenin precursor biosynthesis.

Recently, Dobritsa et al. (2010) suggested that LAP5/PKSB and LAP6/PKSA could play roles both in the synthesis of alkylpyrones and in synthesis of phenolic constituents of sporopollenin in exine (Dobritsa et al., 2010). Metabolic profiling of developing anthers indicated that several flavonoids, including chalcone, naringenin, dihydrokaempferol, and isorhamnetin 3-sophoroside, were significantly reduced in single mutants and undetectable in the double mutant. However, such flavonoids are not likely to be direct products of LAP5/PKSB or/and LAP6/PKSA. Whereas LAP5/PKSB and LAP6/PKSA are closely related to CHS, the recombinant enzymes do not exhibit CHS activity (Dobritsa et al., 2010). Furthermore, whereas CHS activity and flavonoid biosynthesis appear to be crucial to pollen development in some plants (Mo et al., 1992; van der Meer et al., 1992; Fischer et al., 1997; Höfig et al., 2006; Schijlen et al., 2007), complete disruption of *CHS* expression in *Arabidopsis*, leading to the absence of foliar anthocyanins and flower flavonoids, has no impact on male or female fertility (Burbulis et al., 1996), suggesting that CHS-generated flavonoids are not required for normal *Arabidopsis* pollen development.

One possible reason for reduced flavonoid levels in *pksa*, *pkbs*, and *pkas pkbs* mutants is that the defective exine walls of pollen grains in these mutants affect subsequent deposition of pollen coat tryphine that contains phenolics, flavonoids, fatty acid derivatives, and proteins (Piffanelli et al., 1998; Scott et al., 2004; Grienenberger et al., 2009). Thus, reduction or absence of flavonoids could be the indirect consequence of reduced deposition of flavonoid-containing tryphine. Consistent with this, pollen coat deposition is affected in the *pkas* and *pkbs* mutants and is more severely deficient in the *pkbs* mutant (Figures 6M to 6O). The more severe tryphine defect in *lap5/pkbs* observed in TEM images is consistent with the much greater reduction of flavonoid accumulation *lap5/pkbs* anthers relative to *lap6/pksa* anthers (Dobritsa et al., 2010).

LAP6/PKSA and LAP5/PKSB accept multiple substrates and generate multiple products *in vitro* (Figures 10 to 12; Mizuuchi et al., 2008; Dobritsa et al., 2010), some of which may be derailment products due to incomplete catalysis. Thus, pool size of potential substrates *in vivo*, together with activities of native enzymes that may function as part of a complex or complexes *in vivo*, may dictate the nature of *in vivo* products formed by these enzymes. *PKSA* and *PKSB* are strongly coexpressed in tapetum cells with *ACOS5* (de Azevedo Souza et al., 2009; Figure 3),

ACOS5 preferentially generates hydroxy fatty acyl-CoAs but has no activity toward hydroxycinnamic acids (de Azevedo Souza et al., 2009), and PKSA preferentially accepts hydroxy fatty acyl-CoAs to generate tri- and tetraketide α -pyrones. These observations suggest that the most plausible in vivo substrates for PKSA and PKSB are hydroxy fatty acyl-CoAs rather than phenolics, such as hydroxycinnamoyl-CoAs, and that alkyl pyrones are natural products generated by PKSA and PKSB that are required for sporopollenin biosynthesis. The biosynthesis of the tri- and tetraketide α -pyrones in plants has not been well studied, and their presence in *Arabidopsis* has not been reported. Thus, while our results indicate that the in vivo functions of PKSA and PKSB are to catalyze condensation of malonyl-CoA with hydroxy fatty acyl-CoAs generated by ACOS5 to generate alkyl pyrones, this hypothesis requires further testing. For example, reduction of keto functions after elongation of the chain by PKSA/PKSB would prevent the formation of the α -pyrone ring, and alkyl phloroglucinols could be formed as sporopollenin natural products. However, the strong substrate preferences for tapetum-expressed reductases DRL1/TKPR1 and TKPR2, involved in sporopollenin biosynthesis, for the in vitro tetraketide α -pyrone product (Grienberger et al., 2010) support the hypothesis that these are true PKSA/PKSB-derived natural products.

The tri- and tetraketide α -pyrones generated in vitro by PKSA and PKSB also contain a ketone group on the α -pyrone rings and an additional ketone on the alkyl carbon chain, in the case of the tetraketide (Figures 10 and 11). These carbonyl groups could be the targets for further reduction to generate even more highly hydroxylated polyketides. Candidate enzymes for such activity are TKPR1 (DRL1) and the closely related TKPR2. Indeed, in the companion article (Grienberger et al., 2010), we show that DRL1/TKPR1 and a close homolog encode tetraketide α -pyrone reductases that specifically catalyze the reduction of the acyl ketone group of the tetraketide α -pyrone generated by PKSA and PKSB. Polyhydroxylation of polyketide α -pyrone sporopollenin precursors and other potential sporopollenin constituents, such as fatty acids and/or fatty alcohols, contributing to the strong chemical and physical resistance of the sporopollenin polymer.

Conservation of PKSA and PKSB Functions in a Sporopollenin Precursor Biosynthetic Pathway

Phylogenetic analysis (Figure 1) showed that the plant PKS clade containing PKSA and PKSB is clearly distinct from the clade containing the bona fide *Arabidopsis* and *Physcomitrella* CHS genes and other putative CHS genes from poplar and rice. This relationship between the true CHS genes and the PKS CHS-like (CHSL) genes, also observed by others (Mizuuchi et al., 2008; Wu et al., 2008; Dobritsa et al., 2010), is similar to the relationship between ACOS5 and true 4CL enzymes (de Azevedo Souza et al., 2008, 2009). The CHSL clade containing PKSA and PKSB has two distinct subclades of angiosperm PKS genes that are related to either *Arabidopsis* PKSA or PKSB, with at least one PKSA and one PKSB homolog found in each of the fully sequenced poplar and rice genomes. In addition, the *N. sylvestris*

PKSA homolog CHS1k (Atanassov et al., 1998) and *S. latifolia* PKSB homolog CHSL (Ageez et al., 2005) are known to be expressed in male reproductive organs, and the wheat and triticale homologs of the *Arabidopsis* PKSA also have anther and tapetum-preferred expression patterns (Wu et al., 2008).

The CHSL subclade containing *Arabidopsis* PKSA and PKSB contains both pine and *Physcomitrella* members, both of which occupy positions at or near the base of the clade (Figure 1). The *P. radiata* CHS1 gene is specifically expressed in male cones and is likely tapetum expressed (Walden et al., 1999). We surveyed the expression pattern of the *Physcomitrella* PKS (CHS10) gene (Jiang et al., 2006; Koduri et al., 2010), an apparent PKSA and PKSB homolog (Figure 1), by assessing transcript abundance in a *P. patens* cDNA database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/library.cgi?LID=23755&PAGE=1>). This analysis showed that Pp-CHS10 cDNAs are found exclusively in a library derived from RNA extracted from the sporophyte. Together, these data suggest a conserved function in sporopollenin monomer biosynthesis for PKSA and PKSB and their apparent orthologs in land plants and indicate that this function arose early in land plant evolution prior to the divergence of bryophytes and tracheophytes. The exine in pollen walls may have evolved a more elaborate structure in seed plants, based on specialized functions of the duplicated PKSA and PKSB genes found in common within the angiosperm lineage.

The remarkable conservation of *Arabidopsis* PKSA and PKSB, ACOS5 (de Azevedo Souza et al., 2009), and CYP703A2 (Morant et al., 2007) genes in land plants suggests that the encoded enzymes are part of an ancient sporopollenin biosynthetic pathway. The in vitro biochemical functions of PKSA and PKSB that we explored in detail, together with similar data on ACOS5 and CYP703A2, the coordinated coexpression of these genes in the tapetum during free microspore stages of anther development, and the ER localization of PKSA and PKSB support the hypothesis that this pathway catalyzes sequential modification of fatty acid starter molecules to generate integral sporopollenin components of the pollen exine. Based on these data, we propose a reaction sequence localized to the ER leading from hydroxylation of medium- to long-chain fatty acids (catalyzed by CYP703A2), to fatty acyl-CoA formation (catalyzed by ACOS5), and condensation of fatty acyl-CoAs with malonyl-CoA (catalyzed by PKSA and PKSB) to generate triketide and tetraketide α -pyrone sporopollenin precursors. The accompanying article (Grienberger et al., 2010) extends this work and shows that reductases encoded by tapetum-expressed DRL/TKPR genes are also part of this pathway and accept the tetraketide α -pyrone product generated by PKSA and PKSB in vitro to form reduced derivatives that appear to be sporopollenin precursors.

METHODS

Plant Material and Growth Conditions

Arabidopsis thaliana Columbia (Col-0) seeds were sterilized and after a cold treatment (2 d at 4°C in the dark) and germinated at 20°C under 70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fluorescent lighting. Twelve days later, the plants were transferred to a growth chamber with a light/dark cycle of 16 h/8 h. T-DNA insertion mutants were obtained from SALK, SAIL (Alonso et al., 2003),

and Gabi-Kat (Rosso et al., 2003) collections via The Arabidopsis Information Resource and the Nottingham Arabidopsis Stock Centre. In progeny, homozygous insertion lines SALK_079287, SALK_134643 (*PKSA*), GK_089C04, GK_454C04, and GK_580A09 (*PKSB*) were identified by PCR using gene-specific and T-DNA-specific primers (see Supplemental Table 2 online). *Nicotiana benthamiana* plants were grown in a growth chamber under 3000 lux lighting and a light/dark cycle of 16 h/8 h at $21 \pm 2^\circ\text{C}$.

Phylogenetic and Bioinformatic Analyses

All sequences obtained are given in Supplemental Table 1 and Supplemental Data Set 1 online. Protein sequences were aligned using MUSCLE 3.6 using the default parameters (sequencing clustering; UPGMA, objective score; classic sum-of-pairs score) (Edgar, 2004), and the multiple protein sequence alignments were manually optimized. Aligned sequences are available in Supplemental Data Set 2 online. To reconstruct phylogenetic trees, maximum likelihood analyses with 1000 bootstrap replicates were performed using PhyML v2.4.4 and default settings (Guindon and Gascuel, 2003) with the JTT model of amino acid substitution.

RT-PCR

RNA quality was assessed by visual inspection of rRNA on a 1.2% formaldehyde-agarose gel and quantified spectrophotometrically, and 2.5 μg RNA/20 μL reaction was used to generate first-strand cDNA using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen) following the manufacturer's protocol. For RT-PCR, gene-specific and intron-spanning primers (see Supplemental Table 2 online) were used in PCR reactions to amplify corresponding cDNA sequences under the following PCR conditions: 95°C for 3 min, followed by 35 cycles of (94°C for 30 s, 56°C for 30 s, and 72°C for 1 min) followed by 72°C for 10 min, using Taq polymerase in a 50- μL total reaction. *Actin2* was used as control.

For quantitative RT-PCR analysis of *PKSA* and *PKSB* expression, 10 ng of cDNA was incubated with 10 μL iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) and 5 pmol of each forward and reverse primer (see Supplemental Table 2 online) in a total volume of 20 μL . After an initial denaturation step at 95°C for 3 min, 40 cycles at 95°C for 15 s, 60°C for 15 s, and 72°C for 30 s were followed by a fluorescence reading. A melting curve was generated ranging from 95 to 60°C . Threshold cycles (CT) were adjusted manually, and the CT values for a housekeeping control *Actin2* amplified in parallel on each plate were subtracted from CT values obtained for each gene of interest, thus generating normalized CT values (ΔCT). The relative starting quantities of each gene were determined by setting as a base value the gene with the highest CT value within a tissue panel or treatment series, and relative quantities were calculated using the $\Delta\Delta\text{CT}$ method as described by Hietala et al. (2003). $\Delta\Delta\text{CT}$ was calculated using immature flower buds as the highest expressing tissue.

Phenotypic Analyses

For fluorescence microscopy, pollen was stained with 0.01% auramine O in water for 5 min, washed twice with water, and examined with a Nikon E800 microscope using fluorescein isothiocyanate settings.

For scanning electron microscopy, pollen grains were coated with gold particles (S150A sputter coater; Edwards High Vacuum) for 3 min at 50 mV and viewed with a Philips XL30 ESEM (FEI) under high vacuum conditions and at 20 to 30 kV. The microscope was equipped with a Thornley-Everhart secondary electron detector and a PGT Spirit EDX microanalysis system (Princeton Gamma Tech).

To obtain cross sections of developing anthers, wild-type and homozygous double mutant inflorescences were fixed in FAA (4% paraformaldehyde, 15% acetic acid, and 50% ethanol) overnight and directly dehydrated without postfixation. Samples were then transferred to a

propylene oxide solution and slowly infiltrated with Spurr's epoxy resin (Canemco). For bright-field microscopy, 1- μm sections were cut with glass knives (Leica) on a microtome, mounted on glass slides, heat fixed to the slides, and stained with toluidine blue. Sections were photographed using a light microscope. For in vivo pollen germination assays, wild-type pistils were manually pollinated with wild-type or mutant pollen, and 24 h after pollination, the pistils were harvested and stained as described by Preuss et al. (1993).

For TEM, *Arabidopsis* wild-type and *pksa-1 pksb-3* double mutant inflorescences were fixed with paraformaldehyde and postfixed in osmium tetroxide. Fixed samples were dehydrated in an ethanol gradient up to 100% and then transferred to a propylene oxide solution and slowly embedded in Spurr's resin and allowed to polymerize for at least 48 h. Thin sections (70 nm) were taken using a diamond knife microtome (Reichert Ultracut E). Sections were placed on 100-mesh copper grids and stained for 30 min with uranyl acetate, rinsed thoroughly with water, and stained for 15 min with lead citrate (Sato's Lead). Sections were visualized using a Hitachi H7600 transmission electron microscope. For TEM analysis of *pksa-1* and *pkbs-2* single mutants relative to the wild type, pollen was harvested by shaking open inflorescences in PBS, pH 7.0, and filtering through 50- μm nylon mesh. Pollen was centrifuged at 5000g and fixed in 3% glutaraldehyde. Fixed samples were centrifuged and pellets were taken up in 1% low melting point agarose. Samples were cut in 3-mm³ blocks with a razor blade and postfixed in osmium tetroxide. After dehydration in an ethanol series, pollen was progressively embedded in LR white resin and allowed to polymerize for 48 h. Thin sections (70 nm) were obtained using a diamond knife microtome (Reichert-Jung Ultracut E). Sections were placed on microscope grids and stained for 30 min with uranyl acetate, rinsed with water, and observed using a Hitachi H-600 transmission electron microscope equipped with an Orca HR Hamamatsu camera.

In Situ Hybridization and Validation of RNA Probes

Arabidopsis Col-0 inflorescences were embedded in Paraplast (Sigma-Aldrich), sectioned at 8 μm thickness, and mounted on precharged slides. For sense and antisense *PKSA* and *PKSB* probe synthesis, 1209- and 1200-bp DNA template corresponding to the *PKSA* and *PKSB* coding region, respectively, were PCR amplified from flower cDNA using gene-specific forward and reverse primers (see Supplemental Table 2 online). A T7 polymerase binding site was incorporated into the forward primer for sense probe amplification and in the reverse primer for antisense probe amplification. Digoxigenin-labeled probes were transcribed off the template using T7 polymerase (Roche). Probes were shortened to 200-bp fragments by limited carbonate hydrolysis, quantified, and hybridized to slides. Tissue fixation, embedding, hybridization, and signal detection are described by Quilichini et al. (2010).

To validate specificity of RNA antisense probes, we performed DNA gel blotting. PCR-amplified cDNA clones of *PKSA* and *PKSB* (see Supplemental Table 1 online for primers under "DNA gel blotting") were blotted to positively charged nylon membranes, Hybond-XL (GE Healthcare Life Sciences), using $10\times$ SSC as the transfer buffer. Transfer of cDNA to the nylon membrane was monitored via ethidium bromide. The digoxigenin-labeled probes were prehybridized and hybridized using $1\times$ Denhardt's solution, 50% deionized formamide, 10% dextran sulfate, and 0.2 mg/mL of salmon sperm DNA. The blots were washed twice using $2\times$ SSC and 0.1% SDS at 55°C for 10 min each, three times using $2\times$ SSC at 55°C for 30 min each, and twice using $0.2\times$ SSC at 55°C for 10 min each. The hybridized probes were detected by the addition of BCIP/NBT color reagent (Roche).

Production of Recombinant Proteins and Specific Antibodies

Full coding sequences of genes were cloned in pGEX-KG (Guan and Dixon, 1991) after PCR amplification using forward and reverse primers

and DNA restriction sites as indicated in Supplemental Table 2 online. Error-free constructs were transformed into *Escherichia coli* BL21-G612 strain. Conditions of expression of the recombinant proteins and purification on glutathione-agarose column were as previously described (Hoffmann et al., 2003). Analysis of PKS preparations at the different steps of purification is illustrated in Supplemental Figure 8 online.

Polyclonal antibodies were raised in 2-month-old rabbits by two injections of the purified proteins. For the first injection, 200 µg protein was emulsified with Freund's complete adjuvant. Starting 1 month after first injection, 30-mL blood samples were taken weekly for 4 weeks and then a second injection was performed using 130 µg of protein emulsified with incomplete adjuvant. Finally, 12 d after boost injection, the animal was killed, and 130 to 150 mL of blood (70 to 80 mL of serum) was obtained.

Immunological Techniques

Before use, antibodies were preincubated overnight with an acetonic powder of *Arabidopsis* leaves to eliminate any nonspecific signal. For immunoblotting experiments, the procedures were as described previously (Geoffroy et al., 1990) using antibodies at 1/10,000 dilution and a chemiluminescent substrate (CDP-Star; Bio-Rad) for phosphatase activity detection. Antibody specificity for each PKS protein was enhanced by preincubation with the other recombinant protein. The specificity of the resulting antibodies was demonstrated in immunoblotting experiments with the purified recombinant proteins: each antiserum was shown to recognize the cognate protein, and no cross-reactivity was evidenced with the other PKS recombinant protein (see Supplemental Figure 2 online). For immunohistochemical analysis, flower buds were collected, fixed with an aqueous solution containing 3.7% formaldehyde, 50% ethanol, and 5% acetic acid, dehydrated in an ethanol series, and imbedded in paraplast. Ten-micrometer-thick sections were made with a RM2155 Leica microtome and dried on microscope slides, and paraffin was eliminated with Histoclear (VWR). Before immunolabeling, sections were rehydrated in PBS and then blocked for 1 h in a PBS solution containing 1% BSA, 0.05% Triton, and 5% goat normal serum. The rabbit antiserum was diluted 200-fold in the blocking solution, and sections were incubated in the serum solution overnight at 4°C. Then, after three successive washes with PBS containing 1% BSA and 0.05% Triton, sections were incubated for 1 h at room temperature with alkaline phosphatase-labeled goat anti-rabbit immunoglobulin G (Euromedex) diluted 1/1000 in PBS. Samples were then washed four times in PBS, and, after a final wash in 100 mM Tris-HCl, pH 8.1, phosphatase activity was revealed with 1 mg/mL FastRed aqueous solution (Sigma-Aldrich). Incubation was stopped by washing sections in water and sections, covered with PBS/glycerol (50/50, v/v), were observed under an E800 microscope.

Chemical Synthesis of Fatty Acyl-CoA Esters

Palmitoyl-CoA and stearoyl-CoA esters were chemically prepared from palmitic and stearic acids according to published procedures (Funa et al., 2006). CoA ester preparations were purified by reverse-phase HPLC and characterized by LC-MS/MS analysis. 16-Hydroxyhexadecanoyl-CoA (16-OH-C16-CoA) and 12-hydroxyoctadecanoyl-CoA (12-OH-C18-CoA) were synthesized using a method involving ethyl chloroformate activation of fatty acids as follows. The fatty acid (5.5 molar equivalents) was dissolved in dry THF under argon. To this solution, ethyl chloroformate (5.5 molar equivalents) and triethylamine (5.5 molar equivalents) were added at room temperature, and the resulting mixture was stirred for 30 min.

The mixture was then passed through a syringe filter into a solution of CoA trithium salt (1 molar equivalent) and KHCO_3 (5.5 molar equivalents) in water. To assure solubility of all reaction components, the final THF/water solvent mixture should be (1:1.5). This solution was then stirred for 12 h at room temperature.

The reaction mixture was filtered and purified by HPLC under basic conditions, using buffer A (5 mmol/L ammonium acetate in water) and buffer B (5 mmol/L ammonium acetate in acetonitrile) as eluents and a VP125/21 Nucleodur C₁₈ Gravity (5 µm) column (Macherey and Nagel) as stationary phase at a flow of 25 mL/min.

Subsequent LC-MS-electrospray ionization analyses were performed on an HPLC system from Agilent (1200 series) with an Eclipse XDB-C18, 5-µm column (column dimensions: 150 × 4.60 mm) from Agilent and a Thermo Finnigan LCQ Advantage Max ESI spectrometer. For detection, absorption at 280 nm was followed. As eluents, solvent A (5 mmol/L ammonium acetate in water) and solvent B (5 mmol/L ammonium acetate in acetonitrile) were used at 1 mL/min flow rate. Gradient was as follows: 0 min/90% A/10% B → 1 min/90% A/10% B → 10 min/0% A/100% B → 12 min/0% A/100% B → 15 min/90% A/10% B.

For synthesis of 12-hydroxystearoyl-CoA, 2-hydroxystearic acid (50 mg, 0.17 mmol) was converted into 12-hydroxystearoyl-CoA using the general procedure described above. The crude product was purified by preparative HPLC (0 min/95% A/5% B → 3 min/95% A/5% B → 45 min/80% A/20% B → 50 min/75% A/25% B → 60 min/70% A/30% B → 75 min/0% A/100% B) to yield 23.4 mg 12-hydroxystearoyl-CoA as a white solid (72% yield). LC-MS was as follows: $t_R = 7.25$, m/z calculated for C₃₉H₆₉N₇O₁₈P₃S [M - H]⁻ 1048.37; found 1048.33.

For synthesis of 16-hydroxyhexadecanoyl-CoA, 16-hydroxyhexadecanoic acid (10 mg, 36.8 µmol) was converted into 16-hydroxyhexadecanoyl-CoA using the general procedure described above. The crude product was purified by preparative HPLC (0 min/95% A/5% B → 3 min/95% A/5% B → 45 min/75% A/25% B → 50 min/75% A/25% B → 65 min/70% A/30% B → 75 min/55% A/45% B) to yield 14.3 mg 16-hydroxyhexadecanoyl-CoA as a white solid (40% yield). LC-MS was as follows: $t_R = 6.97$, m/z calculated for C₃₇H₆₅N₇O₁₈P₃S [M - H]⁻ 1020.34; found 1020.25.

Enzyme Activity Assays and Steady State Kinetic Analysis

For ACOS5 activity, in a volume of 100 µL, 5 µg of recombinant protein was incubated in 60 mM phosphate buffer containing 10 mM MgCl₂, 5 mM ATP, 2.5 mM DTT, 1 mM CoASH, and 0.1 mM fatty acid (from a 1 mM stock solution in 0.1% Triton X-100). The mixture was incubated at 30°C. For ACOS5 activity measurements, the reaction was stopped by addition of 10 µL of 1 N HCl and, after extraction of residual fatty acid with ethyl acetate, CoA esters were analyzed by LC-MS/MS. ACOS5 activity was used for the biosynthesis of various fatty acyl-CoA esters that were tested as PKS substrates.

For PKS activity, when chemically synthesized CoA esters were used, 5 µg of enzyme was incubated in 100 µL volume containing 100 µM potassium phosphate, pH 7.0, 0.1 mM fatty acyl-CoA ester, and 0.1 mM malonyl-CoA either unlabeled or [2-¹⁴C]-labeled (25 nCi). PKS activity was evaluated either after TLC and visualization of radioactive reaction products by bioimaging or by LC-MS/MS. PKS activity was also assayed with various fatty acyl-CoA esters synthesized by ACOS5. To that aim, after 15 min ACOS5 incubation, 5 µg of PKSA or PKSB protein were added to the incubation medium together with malonyl-CoA and incubated for an additional hour. Activity was measured as for chemically synthesized fatty acyl-CoA substrates.

Steady state kinetic parameters were determined using six concentrations of substrate, covering a range of 0.2 to ~4 K_m , in enzyme assay buffer (100 mM potassium phosphate, pH 7.2, 0.1% Triton X-100, and 10% glycerol pH 7.2) containing 50 µM [2-¹⁴C] malonyl-CoA. Briefly, 5 µg of enzyme was incubated with appropriate substrates in a reaction volume of 50 µL at 37°C for 10 min and was terminated by acidification with 1 N HCl (3.75 µL). The triketide α-pyrone product was then extracted with ethyl acetate, and the extracts were analyzed by silica TLC (toluene/acetone/acetic acid, 85/15/1 [v/v/v]). K_m and V_{max} were calculated by fitting the data to the Michaelis-Menten equation using GraphPad Prism v. 5.03.

Characterization of Reaction Products by LC-MS/MS

Reaction products dissolved in methanol were injected on Acquity ultraperformance liquid chromatography (UPLC) BEH C18 column (2.1×100 mm, $1.7 \mu\text{m}$) and precolumn (2.1×5 mm, $1.7 \mu\text{m}$). Three-microliter samples were injected and resolved by an increasing gradient of acetonitrile in water containing 0.1% formic acid. Gradient conditions at a flow rate of 0.45 mL/min were as follows: 50 to 100% acetonitrile for 25 min, 100% for 2 min, 100 to 50% for 1 min, and column equilibration at 50% acetonitrile for 4 min.

For analysis by LC-MS/MS, an Acquity UPLC system (Waters) coupled to a Quattro Premier XE triple quadrupole MS system (Waters Micromass) was used. The mass spectrometer was run using Mass-Lynx software. The electrospray ionization source conditions in positive and negative modes were optimized by direct infusion. Nitrogen was used as the nebulization and desolvation gas at flow rates of 50 and 900 L/h, respectively. The source capillary voltage was set to 3 kV and temperature to 135°C. Cone tension was optimized at 25 V and desolvation performed at 400°C. In collision-induced dissociation experiments, argon was used as collision gas at a pressure of 3×10^{-3} mbar. Full-scan, selected ion recording, daughter scan, and multiple reaction monitoring modes were used for analysis.

Subcellular Localization

For subcellular localization of PKSA and PKSB, N-terminal fusions of the corresponding cDNAs to eGFP were PCR amplified using the primer pairs given in Supplemental Table 2 online and inserted into the expression vector pB7FWG2 (VIB) using the Gateway cloning system (Invitrogen). The mRFP fluorescent protein with the C-terminal extension-HDEL served as an ER marker protein (Robinson et al., 2007). Constructs were transiently expressed in *N. benthamiana* leaves by agroinfiltration and imaged as described (Grienenberger et al., 2010).

Accession Numbers

Sequence data from this article can be found in the Arabidopsis Genome Initiative, GenBank/EMBL, or other databases under the following accession numbers: *Arabidopsis* PKSA, At1g02050; *Arabidopsis* PKSB, At4g34850; *Arabidopsis* Actin2, At3g18780; *Arabidopsis* CHSL2, At4g00040; *Oryza sativa* CHSL1, LOC_Os10g34360 (<http://rice.plantbiology.msu.edu/index.shtml>); *O. sativa* CHSL2, LOC_Os07g22850 (<http://rice.plantbiology.msu.edu/index.shtml>); *Physcomitrella patens* CHS10, protein ID 149790 (http://genome.jgi-psf.org/Phypa1_1/Phypa1_1.home.html); *Pinus radiata* CHS1, AAB80804; *Nicotiana glauca* CHSLK, CAA74847; *Silene latifolia* Chs, AB182106; *Populus trichocarpa* CHSL4, protein ID 551991 (<http://genome.jgi-psf.org/poplar/poplar.home.html>); *P. trichocarpa* CHSL5, protein ID 591704 (<http://genome.jgi-psf.org/poplar/poplar.home.html>); *P. trichocarpa* CHSL6, protein ID 556583 (<http://genome.jgi-psf.org/poplar/poplar.home.html>); and *P. trichocarpa* CHSL, protein ID 200918 (<http://genome.jgi-psf.org/poplar/poplar.home.html>).

Supplemental Data

The following materials are available in the online version of this article.

Supplemental Figure 1. Accumulation of PKSA and PKSB Proteins during Flower Development.

Supplemental Figure 2. Characterization of Antibodies Raised against PKS Proteins.

Supplemental Figure 3. DNA Gel Blotting with RNA Antisense Probe of Either PKSA or PKSB against PCR-Amplified PKSA and PKSB Coding Sequence.

Supplemental Figure 4. Phenotypic Effects of *pksa-2* and *pkbs-1* Alleles on Exine Formation.

Supplemental Figure 5. Pollen Tube Growth Assay of *pksa-1* and *pkbs-2* Mutant Pollen.

Supplemental Figure 6. Exine Defects in Pollen Grains of the Double Mutant *pksa-1 pkbs-2*.

Supplemental Figure 7. Anther Development of Double Mutant *pksa-1 pkbs-3*.

Supplemental Figure 8. Analysis of Recombinant Protein Preparations at Different Steps of Purification.

Supplemental Table 1. Putative PKSA and PKSB Orthologs and Expression in Other Species.

Supplemental Table 2. Primer Sequences Used in This Study.

Supplemental Data Set 1. Amino Acid Sequences Used in Construction of the Phylogenetic Tree Shown in Figure 1.

Supplemental Data Set 2. Alignment of Amino Acid Sequences Used to Generate the Phylogenetic Tree Shown in Figure 1.

ACKNOWLEDGMENTS

The assistance of D. Meyer (Institut de Biologie Moléculaire des Plantes) in histochemical analysis, M. Alioua (Institut de Biologie Moléculaire des Plantes) in DNA sequencing, and M. Erhardt (Institut de Biologie Moléculaire des Plantes) for TEM is gratefully acknowledged. We thank J.-H. Lignot (Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, Strasbourg) for kind help with scanning electron microscopy, C. Ritzenthaler (Institut de Biologie Moléculaire des Plantes) for help with confocal microscopy, and D. Debayle (Institut de Biologie Moléculaire des Plantes) for assistance in LC-MS/MS analysis at the initial stages of the work. We are grateful to the Salk Genomic Analysis Laboratory (La Jolla, CA), the Institut National de la Recherche Agronomique Versailles (France), and Bielefeld University (Germany) for providing the T-DNA mutants and to the ABRC and Nottingham Arabidopsis Stock Center for distributing the seeds. The UPLC-MS/MS system was cofinanced by the Centre National de la Recherche Scientifique, the Université de Strasbourg, the Région Alsace, the Institut National de la Recherche Agronomique, and Tepral Company. We also thank Michael Friedmann and Teagen Quilichini (University of British Columbia) for helpful comments and advice and the University of British Columbia Biolmaging Facility for technical assistance and advice. This work was supported by doctoral fellowships of the Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche to E.G. and B.L., and by Natural Sciences and Engineering Research Council discovery grants to C.J.D. and D.-Y.S.

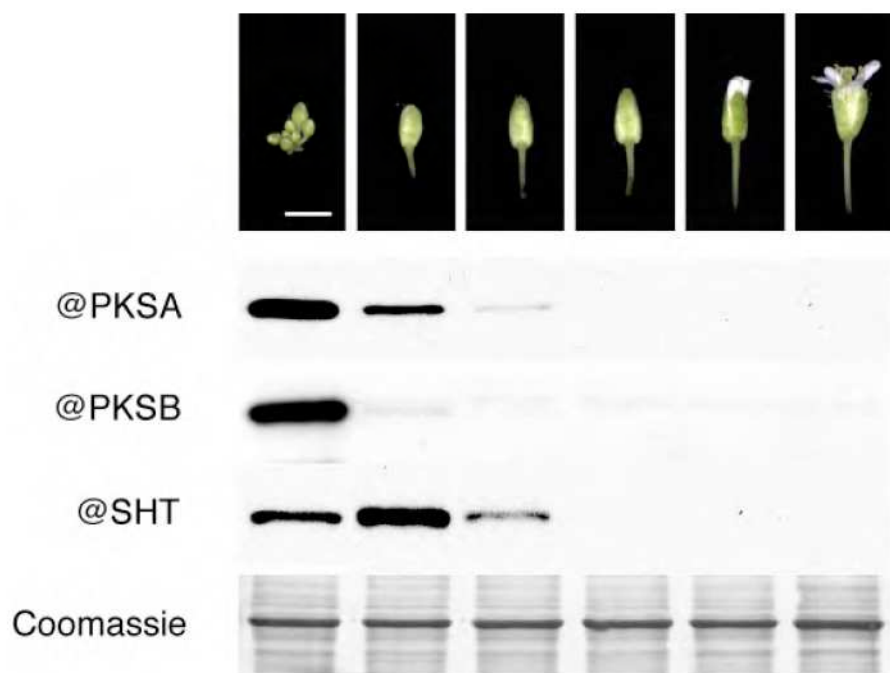
Received October 1, 2010; revised November 24, 2010; accepted December 14, 2010; published December 30, 2010.

REFERENCES

- Aarts, M.G., Hodge, R., Kalantidis, K., Florack, D., Wilson, Z.A., Mulligan, B.J., Stiekema, W.J., Scott, R., and Pereira, A. (1997). The Arabidopsis MALE STERILITY 2 protein shares similarity with reductases in elongation/condensation complexes. *Plant J.* **12**: 615–623.
- Abe, I., Oguro, S., Utsumi, Y., Sano, Y., and Noguchi, H. (2005). Engineered biosynthesis of plant polyketides: Chain length control in an octaketide-producing plant type III polyketide synthase. *J. Am. Chem. Soc.* **127**: 12709–12716.
- Abe, I., Watanabe, T., and Noguchi, H. (2004). Enzymatic formation of

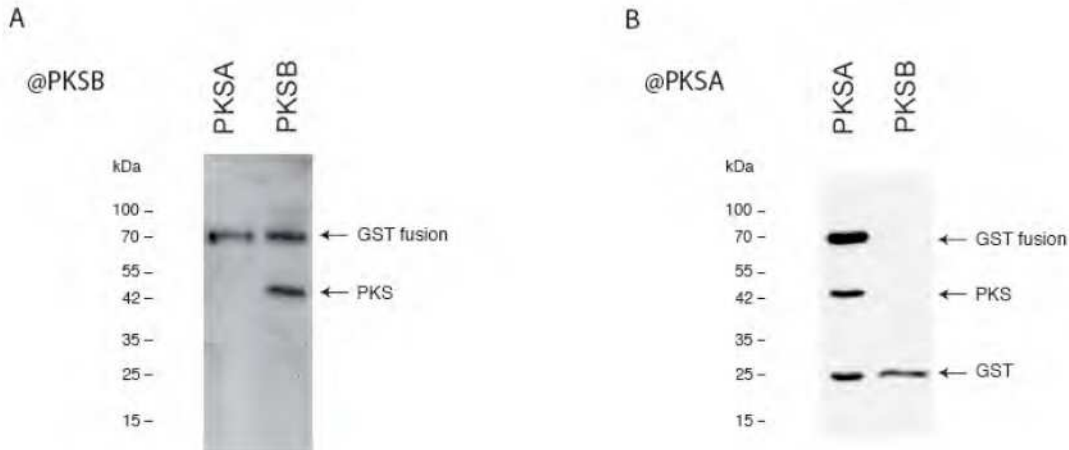
- long-chain polyketide pyrones by plant type III polyketide synthases. *Phytochemistry* **65**: 2447–2453.
- Ageez, A., Kazama, Y., Sugiyama, R., and Kawano, S.** (2005). Male-fertility genes expressed in male flower buds of *Silene latifolia* include homologs of anther-specific genes. *Genes Genet. Syst.* **80**: 403–413.
- Ahlers, F., Bubert, H., Steuernagel, S., and Wiermann, R.** (2000). The nature of oxygen in sporopollenin from the pollen of *Typha angustifolia* L. *Z. Naturforsch., C, J. Biosci.* **55**: 129–136.
- Ahlers, F., Lambert, J., and Wiermann, R.** (2003). Acetylation and silylation of piperidine solubilized sporopollenin from pollen of *Typha angustifolia* L. *Z. Naturforsch., C, J. Biosci.* **58**: 807–811.
- Alonso, J.M., et al.** (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**: 653–657.
- Arizumi, T., Hatakeyama, K., Hinata, K., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., and Toriyama, K.** (2003). A novel male-sterile mutant of *Arabidopsis thaliana*, faceless pollen-1, produces pollen with a smooth surface and an acetolysis-sensitive exine. *Plant Mol. Biol.* **53**: 107–116.
- Atanassov, I., Russinova, E., Antonov, L., and Atanassov, A.** (1998). Expression of an anther-specific chalcone synthase-like gene is correlated with uninucleate microspore development in *Nicotiana sylvestris*. *Plant Mol. Biol.* **38**: 1169–1178.
- Austin, M.B., and Noel, J.P.** (2003). The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. *Nat. Prod. Rep.* **20**: 79–110.
- Bedinger, P.** (1992). The remarkable biology of pollen. *Plant Cell* **4**: 879–887.
- Blackmore, S., Wortley, A.H., Skvarla, J.J., and Rowley, J.R.** (2007). Pollen wall development in flowering plants. *New Phytol.* **174**: 483–498.
- Bohne, G., Richter, E., Woehlecke, H., and Ehwald, R.** (2003). Diffusion barriers of tripartite sporopollenin microcapsules prepared from pine pollen. *Ann. Bot. (Lond.)* **92**: 289–297.
- Bowman, J.L., Floyd, S.K., and Sakakibara, K.** (2007). Green genes-comparative genomics of the green branch of life. *Cell* **129**: 229–234.
- Bubert, H., Lambert, J., Steuernagel, S., Ahlers, F., and Wiermann, R.** (2002). Continuous decomposition of sporopollenin from pollen of *Typha angustifolia* L. by acidic methanolysis. *Z. Naturforsch., C, J. Biosci.* **57**: 1035–1041.
- Burbulis, I.E., Iacobucci, M., and Shirley, B.W.** (1996). A null mutation in the first enzyme of flavonoid biosynthesis does not affect male fertility in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **8**: 1013–1025.
- Chen, X., Goodwin, S.M., Boroff, V.L., Liu, X., and Jenks, M.A.** (2003). Cloning and characterization of the WAX2 gene of *Arabidopsis* involved in cuticle membrane and wax production. *Plant Cell* **15**: 1170–1185.
- de Azevedo Souza, C., Barbazuk, B., Ralph, S.G., Bohlmann, J., Hamberger, B., and Douglas C.J.** (2008). Genome-wide analysis of a land plant-specific acyl:coenzymeA synthetase (ACS) gene family in *Arabidopsis*, poplar, rice, and *Physcomitrella*. *New Phytol.* **179**: 987–1003.
- de Azevedo Souza, C., Kim, S.S., Koch, S., Kienow, L., Schneider, K., McKim, S.M., Haughn, G.W., Kombrink, E., and Douglas, C.J.** (2009). A novel fatty Acyl-CoA Synthetase is required for pollen development and sporopollenin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21**: 507–525.
- Doan, T.T., Carlsson, A.S., Hamberg, M., Bülow, L., Stymne, S., and Olsson, P.** (2009). Functional expression of five *Arabidopsis* fatty acyl-CoA reductase genes in *Escherichia coli*. *J. Plant Physiol.* **166**: 787–796.
- Dobritsa, A.A., Lei, Z., Nishikawa, S., Urbanczyk-Wochniak, E., Huhman, D.V., Preuss, D., and Sumner, L.W.** (2010). *LAP5* and *LAP6* encode anther-specific proteins with similarity to chalcone synthase essential for pollen exine development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **153**: 937–955.
- Dobritsa, A.A., Shrestha, J., Morant, M., Pinot, F., Matsuno, M., Swanson, R., Møller, B.L., and Preuss, D.** (2009). CYP704B1 is a long-chain fatty acid omega-hydroxylase essential for sporopollenin synthesis in pollen of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **151**: 574–589.
- Edgar, R.C.** (2004). MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* **32**: 1792–1797.
- Fischer, R., Budde, I., and Hain, R.** (1997). Stilbene synthase gene expression causes changes in flower colour and male sterility in tobacco. *Plant J.* **11**: 489–498.
- Flores-Sanchez, I.J., and Verpoorte, R.** (2009). Plant polyketide synthases: A fascinating group of enzymes. *Plant Physiol. Biochem.* **47**: 167–174.
- Franke, R., and Schreiber, L.** (2007). Suberin—A biopolyester forming apoplastic plant interfaces. *Curr. Opin. Plant Biol.* **10**: 252–259.
- Funa, N., Ozawa, H., Hirata, A., and Horinouchi, S.** (2006). Phenolic lipid synthesis by type III polyketide synthases is essential for cyst formation in *Azotobacter vinelandii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**: 6356–6361.
- Funabashi, M., Funa, N., and Horinouchi, S.** (2008). Phenolic lipids synthesized by type III polyketide synthase confer penicillin resistance on *Streptomyces griseus*. *J. Biol. Chem.* **283**: 13983–13991.
- Geoffroy, P., Legrand, M., and Fritig, B.** (1990). Isolation and characterization of a proteinaceous inhibitor of microbial proteinases induced during the hypersensitive reaction of tobacco to tobacco mosaic virus. *Mol. Plant Microbe Interact.* **3**: 327–333.
- Grienenberger, E., Besseau, S., Geoffroy, P., Debayle, D., Heintz, D., Lapierre, C., Pollet, B., Heitz, T., and Legrand, M.** (2009). A BAHD acyltransferase is expressed in the tapetum of *Arabidopsis* anthers and is involved in the synthesis of hydroxycinnamoyl spermidines. *Plant J.* **58**: 246–259.
- Grienenberger, E., Kim, S.S., Lallemand, B., Geoffroy, P., Heintz, D., de Azevedo Souza, C., Heitz, T., Douglas, C.J., and Legrand, M.** (2010). Analysis of *TETRAKETIDE* α -*PYRONE* *REDUCTASE* function in *Arabidopsis thaliana* reveals a previously unknown, but conserved, biochemical pathway in sporopollenin monomer biosynthesis. *Plant Cell* **22**: ■■■■.
- Guan, K.L., and Dixon, J.E.** (1991). Eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli*: An improved thrombin cleavage and purification procedure of fusion proteins with glutathione S-transferase. *Anal. Biochem.* **192**: 262–267.
- Guilford, W.J., Schneider, D.M., Labovitz, J., and Opella, S.J.** (1988). High resolution solid state C NMR spectroscopy of sporopollenins from different plant taxa. *Plant Physiol.* **86**: 134–136.
- Guindon, S., and Gascuel, O.** (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* **52**: 696–704.
- Hietala, A.M., Eikenes, M., Kvaalen, H., Solheim, H., and Fosdal, C.G.** (2003). Multiplex real-time PCR for monitoring *Heterobasidion annosum* colonization in Norway spruce clones that differ in disease resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 4413–4420.
- Hoffmann, L., Maury, S., Martz, F., Geoffroy, P., and Legrand, M.** (2003). Purification, cloning, and properties of an acyltransferase controlling shikimate and quinate ester intermediates in phenylpropanoid metabolism. *J. Biol. Chem.* **278**: 95–103.
- Höfig, K.P., Möller, R., Donaldson, L., Putterill, J., and Walter, C.** (2006). Towards male sterility in *Pinus radiata*—A stilbene synthase approach to genetically engineer nuclear male sterility. *Plant Biotechnol. J.* **4**: 333–343.
- Jiang, C., Schommer, C.K., Kim, S.Y., and Suh, D.Y.** (2006). Cloning and characterization of chalcone synthase from the moss, *Physcomitrella patens*. *Phytochemistry* **67**: 2531–2540.
- Koduri, P.K., Gordon, G.S., Barker, E.I., Colpitts, C.C., Ashton, N.W., and Suh, D.Y.** (2010). Genome-wide analysis of the chalcone synthase superfamily genes of *Physcomitrella patens*. *Plant Mol. Biol.* **72**: 247–263.

- Li, H., Pinot, F., Sauveplane, V., Werck-Reichhart, D., Diehl, P., Schreiber, L., Franke, R., Zhang, P., Chen, L., Gao, Y., Liang, W., and Zhang, D.** (2010). Cytochrome P450 family member CYP704B2 catalyzes the omega-hydroxylation of fatty acids and is required for anther cutin biosynthesis and pollen exine formation in rice. *Plant Cell* **22**: 173–190.
- Ma, H.** (2005). Molecular genetic analyses of microsporogenesis and microgametogenesis in flowering plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **56**: 393–434.
- Mizuuchi, Y., Shimokawa, Y., Wanibuchi, K., Noguchi, H., and Abe, I.** (2008). Structure function analysis of novel type III polyketide synthases from *Arabidopsis thaliana*. *Biol. Pharm. Bull.* **31**: 2205–2210.
- Mo, Y., Nagel, C., and Taylor, L.P.** (1992). Biochemical complementation of chalcone synthase mutants defines a role for flavonols in functional pollen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 7213–7217.
- Morant, M., Jørgensen, K., Schaller, H., Pinot, F., Möller, B.L., Werck-Reichhart, D., and Bak, S.** (2007). CYP703 is an ancient cytochrome P450 in land plants catalyzing in-chain hydroxylation of lauric acid to provide building blocks for sporopollenin synthesis in pollen. *Plant Cell* **19**: 1473–1487.
- Pichersky, E., and Gang, D.R.** (2000). Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: An evolutionary perspective. *Trends Plant Sci.* **5**: 439–445.
- Piffanelli, P., Ross, J.H.E., and Murphy, D.J.** (1998). Biogenesis and function of the lipidic structures of pollen grains. *Sex. Plant Reprod.* **11**: 65–80.
- Pollard, M., Beisson, F., Li, Y., and Ohlrogge, J.B.** (2008). Building lipid barriers: Biosynthesis of cutin and suberin. *Trends Plant Sci.* **13**: 236–246.
- Preuss, D., Lemieux, B., Yen, G., and Davis, R.W.** (1993). A conditional sterile mutation eliminates surface components from *Arabidopsis* pollen and disrupts cell signaling during fertilization. *Genes Dev.* **7**: 974–985.
- Quilichini, T.D., Friedmann, M.C., Samuels, A.L., and Douglas, C.J.** (2010). ATP-binding cassette transporter G26 is required for male fertility and pollen exine formation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **154**: 678–690.
- Robinson, D.G., Herranz, M.-C., Bubeck, J., Pepperkok, R., and Ritzenthaler, C.** (2007). Membrane dynamics in the early secretory pathway. *Crit. Rev. Plant Sci.* **26**: 199–225.
- Rosso, M.G., Li, Y., Strizhov, N., Reiss, B., Dekker, K., and Weisshaar, B.** (2003). An *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant Mol. Biol.* **53**: 247–259.
- Rowland, O., Lee, R., Franke, R., Schreiber, L., and Kunst, L.** (2007). The CER3 wax biosynthetic gene from *Arabidopsis thaliana* is allelic to WAX2/YRE/FLP1. *FEBS Lett.* **581**: 3538–3544.
- Rozema, J., Broekman, R.A., Blokker, P., Meijkamp, B.B., de Bakker, N., van de Staaij, J., van Beem, A., Ariese, F., and Kars, S.M.** (2001). UV-B absorbance and UV-B absorbing compounds (para-coumaric acid) in pollen and sporopollenin: the perspective to track historic UV-B levels. *J. Photochem. Photobiol. B* **62**: 108–117.
- Rubin-Pitel, S.B., Zhang, H., Vu, T., Brunzelle, J.S., Zhao, H., and Nair, S.K.** (2008). Distinct structural elements dictate the specificity of the type III pentaketide synthase from *Neurospora crassa*. *Chem. Biol.* **15**: 1079–1090.
- Sanders, P.M., Bui, A.Q., Weterings, K., McIntire, K.N., Hsu, Y.C., Lee, P.Y., Truong, M.T., Beals, T.P., and Goldberg, R.B.** (1999). Anther developmental defects in *Arabidopsis thaliana* male-sterile mutants. *Sex. Plant Reprod.* **11**: 297–322.
- Saxena, P., Yadav, G., Mohanty, D., and Gokhale, R.S.** (2003). A new family of type III polyketide synthases in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* **278**: 44780–44790.
- Schijlen, E.G., de Vos, C.H., Martens, S., Jonker, H.H., Rosin, F.M., Molthoff, J.W., Tikunov, Y.M., Angenent, G.C., van Tunen, A.J., and Bovy, A.G.** (2007). RNA interference silencing of chalcone synthase, the first step in the flavonoid biosynthesis pathway, leads to parthenocarpic tomato fruits. *Plant Physiol.* **144**: 1520–1530.
- Scott, R.J., Spielman, M., and Dickinson, H.G.** (2004). Stamen structure and function. *Plant Cell* **16** (suppl.): S46–S60.
- Suzuki, T., Maseoka, K., Nishi, M., Nakamura, K., and Ishiguro, S.** (2008). Identification of kaonashi mutants showing abnormal pollen exine structure in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **49**: 1465–1477.
- Tang, L.K., Chu, H., Yip, W.K., Yeung, E.C., and Lo, C.** (2009). An anther-specific dihydroflavonol 4-reductase-like gene (DRL1) is essential for male fertility in *Arabidopsis*. *New Phytol.* **181**: 576–587.
- van der Meer, I.M., Stam, M.E., van Tunen, A.J., Mol, J.N., and Stuitje, A.R.** (1992). Antisense inhibition of flavonoid biosynthesis in petunia anthers results in male sterility. *Plant Cell* **4**: 253–262.
- Vizcay-Barrena, G., and Wilson, Z.A.** (2006). Altered tapetal PCD and pollen wall development in the *Arabidopsis* ms1 mutant. *J. Exp. Bot.* **57**: 2709–2717.
- Walden, A.R., Walter, C., and Gardner, R.C.** (1999). Genes expressed in *Pinus radiata* male cones include homologs to anther-specific and pathogenesis response genes. *Plant Physiol.* **121**: 1103–1116.
- Wijeratne, A.J., Zhang, W., Sun, Y., Liu, W., Albert, R., Zheng, Z., Oppenheimer, D.G., Zhao, D., and Ma, H.** (2007). Differential gene expression in *Arabidopsis* wild-type and mutant anthers: Insights into anther cell differentiation and regulatory networks. *Plant J.* **52**: 14–29.
- Wu, S., O'Leary, S.J., Gleddie, S., Eudes, F., Laroche, A., and Robert, L.S.** (2008). A chalcone synthase-like gene is highly expressed in the tapetum of both wheat (*Triticum aestivum* L.) and triticale (xTriticosecale Wittmack). *Plant Cell Rep.* **27**: 1441–1449.



Supplemental Figure 1. Accumulation of PKSA and PKSB proteins during flower development.

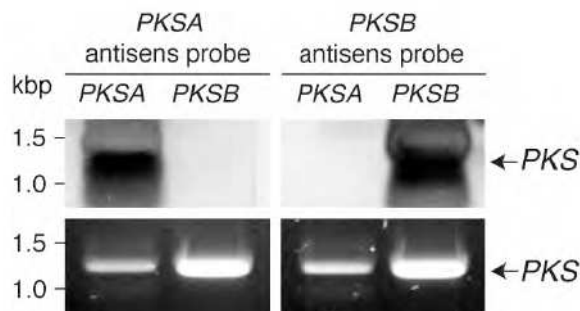
Protein accumulation in wild-type (Col-0) extracts from flowers at various stages of development as shown in the top panel was evaluated by immunoblotting with specific antibodies as indicated. SHT; Spermidine Hydroxycinnamoyl Transferase, At2g19070, was used as an internal marker (Grienenberger et al., 2009).



Supplemental Figure 2. Characterization of antibodies raised against PKS proteins.

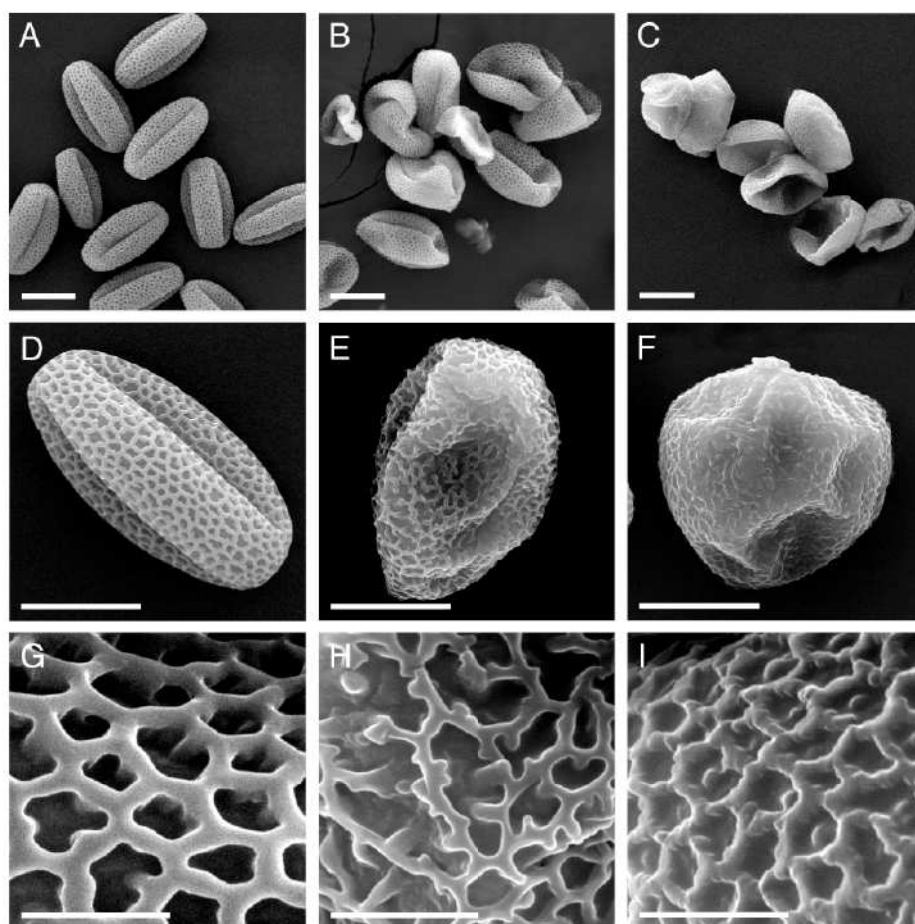
Purified recombinant PKSA and PKSB proteins were immunoblotted with each polyclonal serum.

(A) Antibodies raised against PKSB recombinant protein and pre-incubated in the presence of PKSA protein to eliminate any cross-reaction were used. PKSB was revealed and PKSA was not. Both fusion proteins were recognized due to their common GST moiety. **(B)** Antibodies raised against PKSA recombinant protein readily recognized PKSA but not PKSB.



Supplemental Figure 3. DNA gel blot showing specificity of PKSA or PKSB RNA probes used for *in situ* hybridization.

PKSA and *PKSB* dioxygenin labeled antisense probes were hybridized against a blot of PCR-amplified full-length *PKSA* and *PKSB* coding sequences (above). The Fast Red stained gel prior to Southern blot transfer is shown below.



Supplemental Figure 4. Phenotypic effects of *pksa-2* and *pksb-1* alleles on exine formation.

Pollen from T-DNA mutant alleles distinct from those presented in Figure 6 were analyzed by SEM.

(A), (D) and (G), wild-type pollen

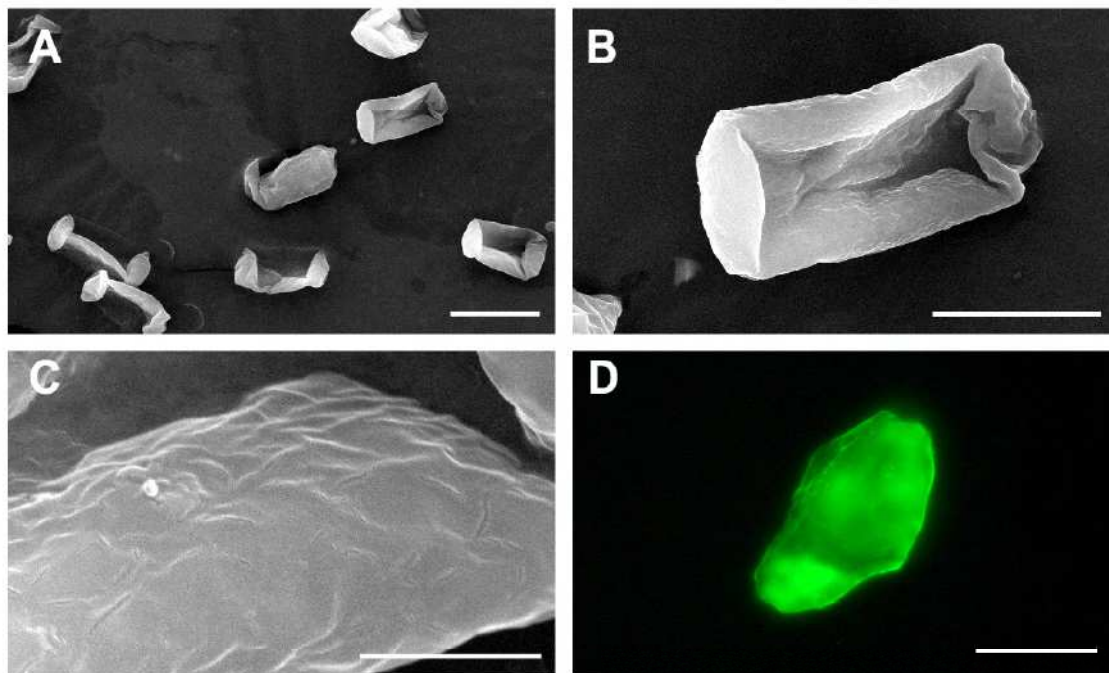
(B), (E) and (H), *pksa-2* (SALK_079287) pollen

(C), (F) and (I), *pksb-1* (GK_580A09) pollen

Scale bar = 10μm, (A) to (F); 2μm, (G) to (I).



Supplemental Figure 5. Pollen tube growth assay of *pksa-1* and *pksb-2* mutant pollen. *pksa-1*, *pksb-2*, and wild-type (Col-0) pollen was placed on Col-0 stigmata, allowed to germinate, and pollen tubes observed with aniline blue staining and fluorescence microscopy.

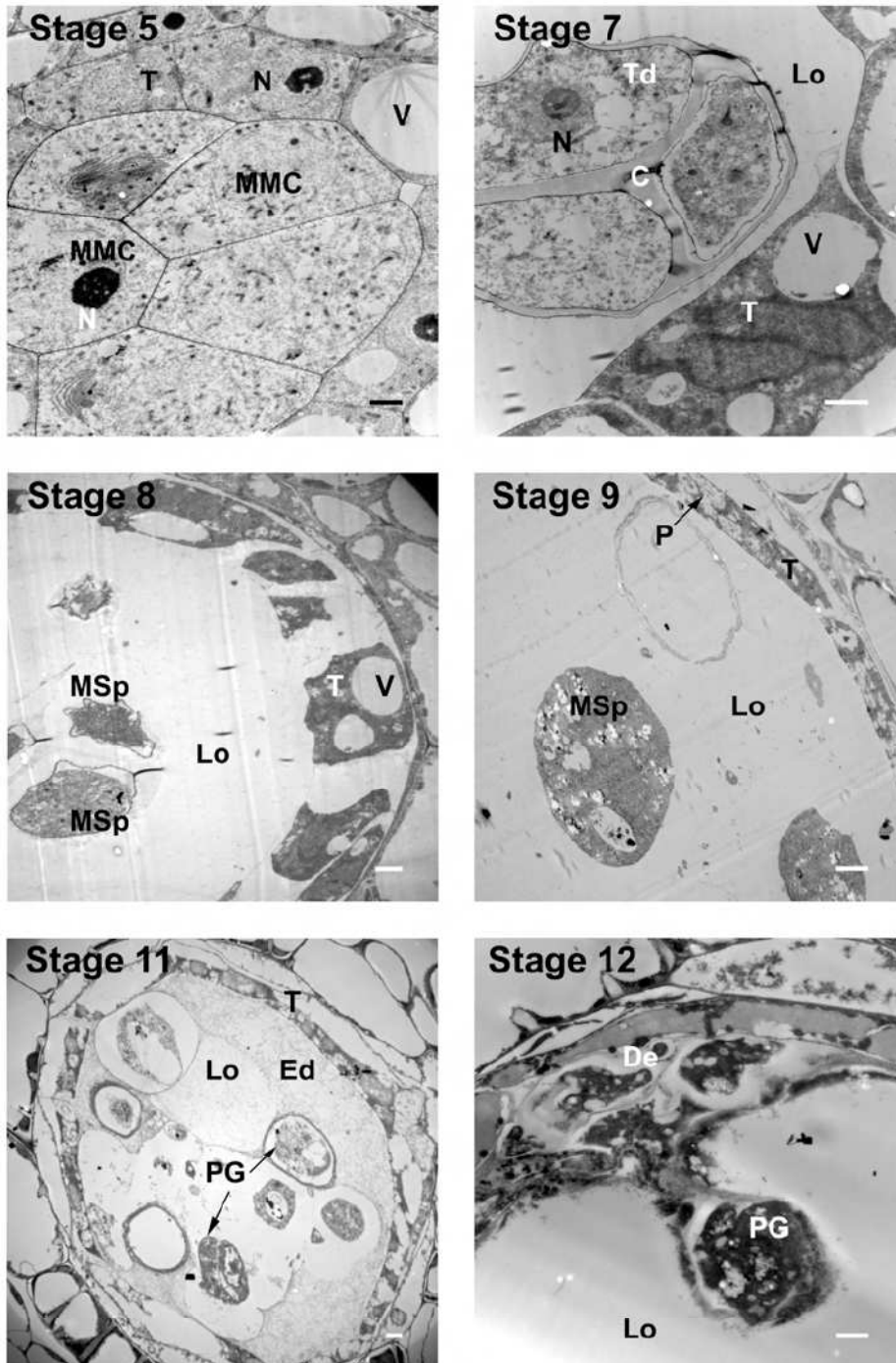


Supplemental Figure 6. Exine defects in pollen grains of double mutant *pksa-1 pksb-2*.

Plant homozygous for the *pksa-1 pksb-2* alleles were grown to maturity and pollen grains analyzed by SEM and auramine O staining.

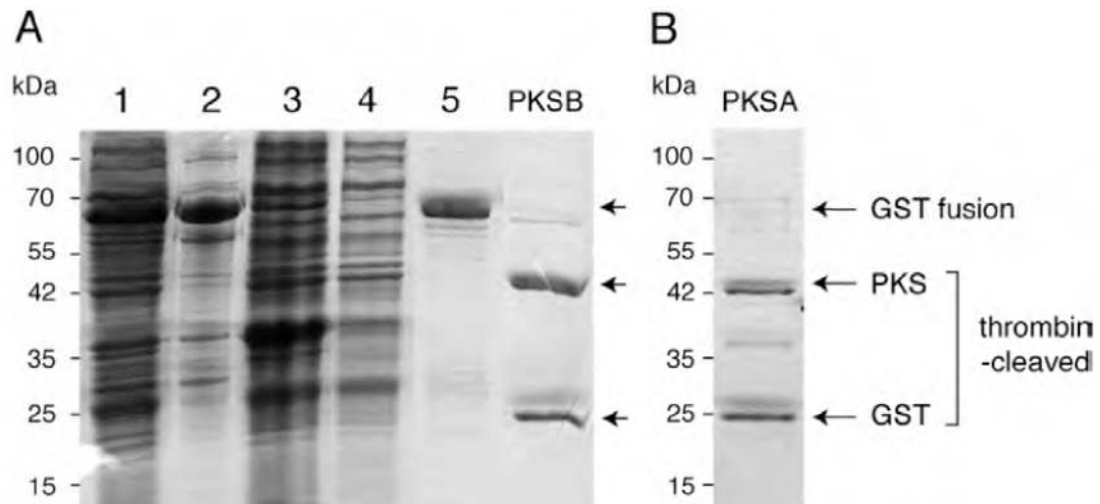
(A) to (C) SEM images of the same pollen samples at three magnification values (D) Auramine O staining of *pksa-1 pksb-2* pollen.

Scale bar = 20mm (A); 10mm (B) and (D); 2 mm (C).



Supplemental Figure 7. Anther development of double mutant *pkas-1 pksb-3*.

C, callose wall; De, debris of defective pollen grains; Ed, electron-dense material; Lo, locule; MMC, microspore mother cell; MSp, microspore; N, nucleus; P, plastid filled with plastoglobuli; PG, pollen grain; T, tapetal cell; Td, tetrad; V, vacuole. Scale bar = 2 μ m



Supplemental Figure 8 Analysis of recombinant protein preparations at different steps of purification.

Bacterial protein extracts were prepared and purified as described in Methods section. Protein preparations were analyzed by electrophoresis on SDS-polyacrylamide gels and Coomassie Blue staining.

(A) Purification steps of PKSB are illustrated. Lane 1: total protein; lane 2: insoluble protein fraction; lane 3: soluble proteins; lane 4: flow-through of glutathion-agarose column; lane 5: fusion protein eluted from affinity column; PKSB, thrombin-cleaved purified fraction containing PKSB and GST proteins.

(B) Purified PKSA preparation after affinity chromatography and thrombin cleavage

Supplemental Table 1. Putative *PKSA* and *PKSB* orthologs and expression in other species

Species	Gene name	Accession or gene model	Expression
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>PKSA</i>	At1g02050	Tapetum ¹
	<i>PKSB</i>	At4g34850	Tapetum ¹
	<i>CHSL2</i> ²	At4g00040	Flower and leaf ³
<i>Oryza sativa</i>	<i>CHSL1</i>	Os10g34360	Immature panicle ⁴
	<i>CHSL2</i>	Os07g22850	Immature panicle ⁴
<i>Physcomitrella patens</i>	<i>CHS10</i> ⁵	e_gw1.304.37.1, Protein ID 149790	Sporophyte ⁶
<i>Pinus radiata</i>	<i>CHS1</i>	AAB80804	Male cone ⁷
<i>Nicotiana sylvestris</i>	<i>NSCHSLK</i>	CAA74847	Anther ⁸
<i>Silene latifolia</i>	<i>SICHs</i>	AB182106	Male flower ⁹
<i>Populus trichocarpa</i>	<i>CHSL4</i> ²	LG_II:10548880-10550149	N/A
<i>Populus trichocarpa</i>	<i>CHSL5</i> ²	scaffold_40:395399-396653	N/A
<i>Populus trichocarpa</i>	<i>CHSL6</i> ²	LG_IV:15418736-15420441	N/A
<i>Populus trichocarpa</i>	<i>CHSL7</i> ²	LG_IX:2399625-2400948	N/A

¹ This study

² Tsai et al., New Phytologist 2006; <http://genome.jgi-psf.org/poplar/poplar.home.html>

³ <http://bar.utoronto.ca/>

⁴ <http://mpss.udel.edu/rice/>

⁵ Jiang et al., Phytochemistry 2006; http://genome.jgi-psf.org/Phypa1_1/Phypa1_1.home.html

⁶ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/library.cgi?LID=23755&PAGE=1>

⁷ Walden AR et al., Plant Physiol 1999

⁸ Atanassov I et al., Plant Mol Biol 1998

⁹ Ageez A et al., Genes Genet Syst 2005

N/A, no information available

Analysis of *TETRAKETIDE* α -PYRONE REDUCTASE Function in *Arabidopsis thaliana* Reveals a Previously Unknown, but Conserved, Biochemical Pathway in Sporopollenin Monomer Biosynthesis

Etienne Grienenberger,^{a,1,2} Sung Soo Kim,^{b,1} Benjamin Lallemand,^a Pierrette Geoffroy,^a Dimitri Heintz,^c Clarice de Azevedo Souza,^{b,3} Thierry Heitz,^a Carl J. Douglas,^b and Michel Legrand^{a,4}

^a Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, Unité Propre de Recherche 2357 du Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Strasbourg, 67084 Strasbourg Cedex, France

^b Department of Botany, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia V6T 1Z4, Canada

^c Plate-Forme d'Analyses Métaboliques de l'Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, Institut de Botanique, 67083 Strasbourg Cedex, France

The precise structure of the sporopollenin polymer that is the major constituent of exine, the outer pollen wall, remains poorly understood. Recently, characterization of *Arabidopsis thaliana* genes and corresponding enzymes involved in exine formation has demonstrated the role of fatty acid derivatives as precursors of sporopollenin building units. Fatty acyl-CoA esters synthesized by ACYL-COA SYNTHETASE5 (ACOS5) are condensed with malonyl-CoA by POLYKETIDE SYNTHASE A (PKSA) and PKSB to yield α -pyrone polyketides required for exine formation. Here, we show that two closely related genes encoding oxidoreductases are specifically and transiently expressed in tapetal cells during microspore development in *Arabidopsis* anthers. Mutants compromised in expression of the reductases displayed a range of pollen exine layer defects, depending on the mutant allele. Phylogenetic studies indicated that the two reductases belong to a large reductase/dehydrogenase gene family and cluster in two distinct clades with putative orthologs from several angiosperm lineages and the moss *Physcomitrella patens*. Recombinant proteins produced in bacteria reduced the carbonyl function of tetraketide α -pyrone compounds synthesized by PKSA/B, and the proteins were therefore named TETRAKETIDE α -PYRONE REDUCTASE1 (TKPR1) and TKPR2 (previously called DRL1 and CCRL6, respectively). TKPR activities, together with those of ACOS5 and PKSA/B, identify a conserved biosynthetic pathway leading to hydroxylated α -pyrone compounds that were previously unknown to be sporopollenin precursors.

INTRODUCTION

In flowering plants, pollen grains are formed within the anther tissues of the stamen, the male reproductive organ. Molecular and genetic studies have identified a number of genes that are expressed during stamen and pollen development (Ma, 2005). Many of them regulate anther cell differentiation, tapetum function, and microsporocyte development into pollen grains. In particular, there have been a number of studies that describe

Arabidopsis thaliana mutants showing abnormal pollen structure resulting in male-sterile or partially sterile phenotypes.

The different stages of pollen development have been carefully documented (Owen and Makaroff, 1995; Sanders et al., 1999; Scott et al., 2004; Blackmore et al., 2007). Meiosis in anthers gives rise to haploid microsporocytes arranged in tetrads surrounded by a callose wall. Then, callose is hydrolyzed and the free microsporocytes are released in the anther locule. At this stage, cellulosic primexine and pectocellulosic intine are produced by the developing microspores and constitute the inner layers of the pollen wall. The outer layer of pollen wall, called the exine, is composed primarily of sporopollenin, a polymer of phenylpropanoid and lipidic monomers covalently coupled by ether and ester linkages (Rozema et al., 2001; Bubert et al., 2002; Ahlers et al., 2003). Sporopollenin precursors are produced in the sporophyte tapetal cell layer surrounding the anther locule, then secreted and deposited on the pollen surface. The sporopollenin polymer confers on the exine unparalleled physical strength, chemical inertness, and elasticity. However, the high level of resistance of sporopollenin to chemical degradation makes it particularly difficult to analyze by chemical methods (Bubert et al., 2002; Ahlers et al., 2003).


¹ These authors contributed equally to this work.


² Current address: Department of Botany, University of British Columbia, Vancouver, BC V6T 1Z4, Canada.

³ Current address: Department of Microbiology and Immunology, University of Miami, Leonard Miller School of Medicine, Miami, FL 33136.

⁴ Address correspondence to michel.legrand@ibmp-cnrs.unistra.fr.

The authors responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (www.plantcell.org) are: Carl J. Douglas (carl.douglas@ubc.ca) and Michel Legrand (michel.legrand@ibmp-cnrs.unistra.fr).

 Some figures in this article are displayed in color online but in black and white in the print edition.

 Online version contains Web-only data.

www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.110.080036

Significant progress in our understanding of exine formation processes has been made recently, thanks to genetic and molecular studies of *Arabidopsis* mutants exhibiting defects in exine structure and deposition (Aarts et al., 1997; Paxson-Sowders et al., 2001; Ariizumi et al., 2003, 2004; Ito et al., 2007; Morant et al., 2007; Yang et al., 2007; Guan et al., 2008; Suzuki et al., 2008; de Azevedo Souza et al., 2009; Dobritsa et al., 2009a; Tang et al., 2009). Unfortunately, in most cases, annotations of the mutated *Arabidopsis* genes found to be responsible for pollen phenotypes are primarily based on sequence similarity, and the exact functions of the corresponding proteins in pollen development remain unknown. For example, the *Male sterility2* (*ms2*) mutant exhibits a lack of exine, and *MS2* shows sequence similarity with fatty acyl-CoA reductases (Aarts et al., 1997). In agreement with this observation, bacteria transformed with a *MS2* cDNA produce fatty alcohols from uncharacterized precursors (Doan et al., 2009). A loss-of-function mutation in the *FACELESS POLLEN1/YORE-YORE/WAX2* gene that impacts exine structure and wax synthesis (Ariizumi et al., 2003; Chen et al., 2003; Kurata et al., 2003) was reported recently to be allelic to *CER3*, a gene previously described to fulfill an unknown function in wax synthesis (Rowland et al., 2007). *DIHYDROFLAVONOL 4-REDUCTASE-LIKE1* (*DRL1*), another gene required for pollen development and male fertility (Tang et al., 2009), shares sequence similarity with *DIHYDROFLAVONOL REDUCTASE* (*DFR*), a gene implicated in the biosynthesis of anthocyanins and proanthocyanidins (Shirley et al., 1992), but the *DRL1* enzyme is also of unknown biochemical function.

Recently *acos5*, a male-sterile mutant, and *dex2*, a male-semisterile mutant, have both been shown to be impaired in exine formation (Morant et al., 2007; de Azevedo Souza et al., 2009). For both *ACYL-COA SYNTHETASE5* (*ACOS5*) and *DEX2*, the catalytic activities of the encoded proteins were characterized biochemically, providing evidence for specific roles in sporopollenin biosynthesis. *ACOS5*, originally annotated as a 4-coumarate:CoA ligase-like protein, displays fatty acyl-CoA synthetase activity with medium- to long-chain fatty acids (C8-C18 fatty acids) (de Azevedo Souza et al., 2009), and *DEX2* encodes CYP703A2, which has been shown to in-chain hydroxylate lauric acid (C12:0 fatty acid) (Morant et al., 2007). Recently, CYP704B1 has been demonstrated also to be implicated in exine formation and to catalyze the ω -hydroxylation of long-chain fatty acids (Dobritsa et al., 2009b). These studies unequivocally demonstrate that fatty acids are essential precursors of sporopollenin. At late stages of pollen grain development, lipophilic tryphine is deposited on the surface and within the chambers of exine and constitutes the pollen coat (Scott et al., 2004; Blackmore et al., 2007; Grienberger et al., 2009), but this is a process distinct from exine formation and probably involves a distinct biosynthetic pathway or pathways.

We recently demonstrated that two *Arabidopsis* polyketide synthases, *POLYKETIDE SYNTHASE A* (*PKSA*) and *PKSB*, play critical roles in sporopollenin biosynthesis, acting downstream of *ACOS5*. *pksa* *pkSB* double mutants are completely male sterile and lack an exine. In vitro, both proteins accept fatty acyl-CoA esters synthesized by *ACOS5* and condense them to malonyl-CoA to yield triketide and tetraketide α -pyrones as reaction products (Kim et al., 2010). Here, we show by in situ hybridization

of mRNAs and by immunolocalization of corresponding proteins that two *Arabidopsis* oxidoreductases, one encoded by the *DRL1* gene previously described by Tang et al. (2009) and the other annotated as *CINNAMOYL COA REDUCTASE-LIKE6* (*CCRL6*) (Hamberger et al., 2007), are coexpressed with *ACOS5*, *PKSA*, and *PKSB* in anther tapetum cells. We show that recombinant enzymes produced in bacteria accept the tetraketide α -pyrones produced by *PKSA* and *PKSB* as substrates to reduce the carbonyl function on the tetraketide alkyl chain to a secondary alcohol function. Phylogenetic studies showed that the oxidoreductases belong to a gene family conserved from mosses to flowering plants. Since similar gene conservation holds true for *PKSA*, *PKSB*, and *ACOS5* genes, it appears that the whole biosynthetic pathway leading from medium or long-chain fatty acids to sporopollenin units is highly conserved and may have been a key determinant in the evolution of land plants.

RESULTS

Genes Involved in Pollen Cell Wall Formation Are Tightly Coregulated

Pollen wall formation requires exquisite and coordinated spatio-temporal regulation of numerous biosynthetic genes by specific transcriptional regulators (Alves-Ferreira et al., 2007; Ito et al., 2007; Yang et al., 2007). In particular, many genes involved in exine biosynthesis in *Arabidopsis* have been shown to be repressed by the *MS1* transcription factor in wild-type plants and to be overexpressed in the *ms1* mutant (Ito et al., 2007; Yang et al., 2007). Examination of *Arabidopsis* microarray data showed that, during development of wild-type and *ms1* anthers, several uncharacterized genes are coregulated with genes involved in exine formation. These genes may therefore encode unknown players of sporopollenin biosynthesis (http://bbc.botany.utoronto.ca/ntools/cgi-bin/ntools_expression_angler.cgi; Toufighi et al., 2005). Among the genes coexpressed during pollen development, two were annotated as *CHALCONE SYNTHASE-LIKE* and identified in the companion article to this one (Kim et al., 2010) as encoding *PKSA* and *PKSB*. *PKSA* and *PKSB* catalyze the condensation of fatty acyl-CoA esters produced by *ACOS5* with malonyl-CoA to yield tri- and tetraketide α -pyrone compounds as reaction products (Kim et al., 2010). Several other tightly coregulated genes were annotated as oxidoreductases/dehydrogenases that all have unknown physiological substrates (<http://www.Arabidopsis.org/>). Among them, the proteins encoded by *At4g35420* (*DRL1*; Tang et al., 2009) and *At1g68540* (*CCRL6*; Hamberger et al., 2007) contain putative NAD(P)H binding domains and share 45% identity (see Supplemental Figure 1 online). Both proteins display sequence similarity with two well-characterized plant oxidoreductases: *DFR*, an enzyme of anthocyanin synthesis (35 and 29% identity; 52 and 43% similarity, respectively) (Shirley et al., 1992), and cinnamoyl-CoA reductase (*CCR*) that is involved in lignin biosynthesis (~35% identity and 53% similarity for both *At4g35420* and *At1g68540* encoded proteins) (Lacombe et al., 1997). These plant enzymes belong to a superfamily whose members are also encountered in

microbial and mammalian kingdoms and share a conserved N-terminal sequence that is likely involved in the interactions with NAD(P)H (see Supplemental Figure 1 online) (Baker and Blasco, 1992; Lacombe et al., 1997). *DRL1* has been shown to be required for male fertility (Tang et al., 2009), but neither the *DRL1* expression pattern nor its exact role in pollen wall formation has been described in detail.

At4g35420 and At1g68540 Expression Profiles during Flower Development

We explored publicly available microarray databases, such as Genevestigator (<https://www.genevestigator.com/gv/index.jsp>) (Hruz et al., 2008) and the *Arabidopsis* eFP browser (<http://bbc.botany.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>) (Winter et al., 2007), to determine the tissue expression patterns of *At4g35420* (*DRL1*) and *At1g68540* (*CCRL6*). The results of this search indicated that both were preferentially expressed in young flower buds, in accordance with their high coregulation scores, similar to the expression patterns reported for *PKSA*, *PKSB*, and *ACOS5* (de Azevedo Souza et al., 2009; Kim et al., 2010). To facilitate their designation in the following paragraphs, genes corresponding to *At4g35420* (*DRL1*) and *At1g68540* (*CCRL6*) were named *TETRAKETIDE α -PYRONE REDUCTASE1* (*TKPR1*) and *TKPR2*, respectively, in anticipation of the enzymatic activities described below for the two corresponding proteins.

Measurements of relative mRNA abundance by quantitative RT-PCR in RNA preparations from various organs confirmed the flower-specific expression of *TKPR1* and *TKPR2* in contrast with *At1g25460*, a close homolog (Figure 10) that displayed a strikingly different expression pattern and is expressed mainly in young seedlings (see Supplemental Figure 2 online). Relative protein levels were also investigated by immunoblotting protein extracts with specific polyclonal antibodies raised against the recombinant proteins (Figure 1). The analysis of various organs confirmed that both TKPR proteins specifically accumulated in flowers, and no signal could be detected in extracts from other organs (Figure 1A).

Protein extracts from flower buds at different stages of development were analyzed next, and distinct kinetics of accumulation were found for the two proteins (Figure 1B). Both proteins were most highly abundant in the youngest buds tested, but the *TKPR1* protein disappeared rapidly in more mature buds, whereas *TKPR2* levels decreased more slowly. These differential kinetics of accumulation are comparable to those observed for *PKSA* and *PKSB* (Kim et al., 2010) that are shown here for comparison. This suggests that *TKPR1* and *PKSB* protein levels are tightly coregulated, as are *TKPR2* and *PKSA* levels. *SHT*, an acyltransferase participating in pollen development, was taken as an internal marker in the same bud extracts and displayed a maximum accumulation at a later stage of flower development, in accordance with its role in pollen coat formation (Figure 1B) (Grienerberger et al., 2009).

To determine the precise sites of *TKPR1* and *TKPR2* expression in flower tissues, in situ hybridization and immunolocalization experiments were performed and showed the specific accumulation of both transcripts and proteins in the anthers (Figure 2). In situ hybridization experiments at different stages of

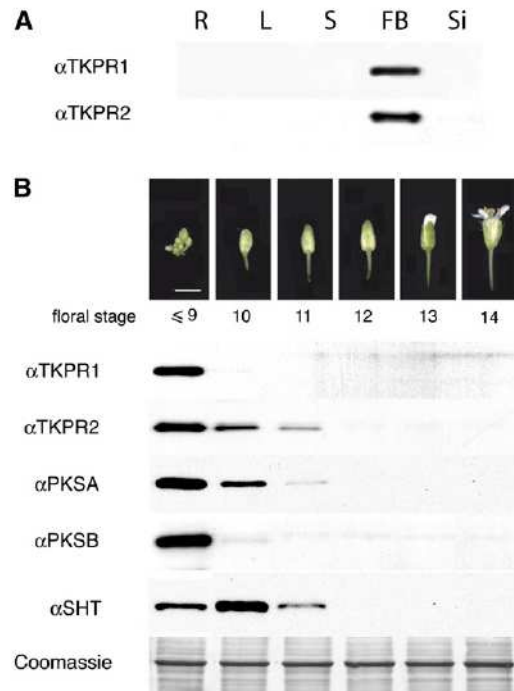


Figure 1. Developmental Expression of TKPR1 and TKPR2 Proteins.

(A) Protein extracts from different plant tissues were immunoblotted with polyclonal antibodies raised against each recombinant protein. Expression levels in roots (R), leaves (L), stems (S), flower buds (FB), and siliques (Si) were compared. Six micrograms of total protein was loaded per lane. **(B)** Comparison of TKPR, PKS, and SHT protein accumulation at the different stages of flower development illustrated in the top photographs. Approximate flower developmental stages are shown as defined by Smyth et al. (1990). Equal loading (6 μ g per lane) of protein is shown by Coomassie blue staining of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase.

[See online article for color version of this figure.]

anther development demonstrated the tapetum-specific expression of both *TKPR* genes. The two genes displayed similar but distinct temporal expression patterns. The highest hybridization signal for both was found at stage 7 of anther development (Figure 2A); however, the *TKPR1* expression pattern was broader over developmental time. Consistent with this, antibodies raised against each recombinant protein detected TKPR protein accumulation specifically in tapetum cells at a later stage (stage 9) of anther development (Figure 2B).

Disruption of Oxidoreductase Genes Differentially Affects Pollen Development

T-DNA insertion alleles in *At4g35420/TKPR1* and *At1g68540/TKPR2* were obtained from public collections (Samson et al., 2002; Alonso et al., 2003), and homozygous populations were generated. Two *tkpr1* alleles and two *tkpr2* alleles were isolated and characterized (Figure 3). We assayed gene expression by RT-PCR with RNA from wild-type and mutant flower buds as

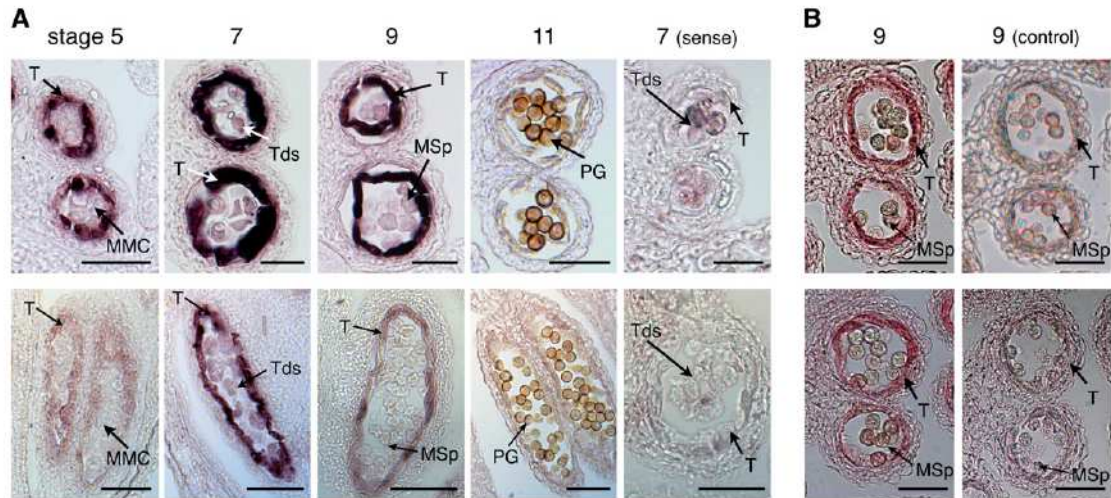


Figure 2. Tapetum-Specific Expression of *TKPR1* and *TKPR2*.

Top panels: *TKPR1* expression; bottom panels: *TKPR2* expression.

(A) *TKPR1* and *TKPR2* mRNAs were localized by in situ hybridization of gene-specific antisense probes to sections of wild-type (Col-0) flowers. Sense probes were used for controls. Stages of anther development are according to Sanders et al. (1999). Dark precipitates indicate hybridization of the probe. Stage 7 shows highest hybridization signals for both of *TKPR1* and *TKPR2* in the tapetum, but *TKPR2* expression was more restricted temporally.

(B) Specific antibodies detected *TKPR1* and *TKPR2* protein accumulation in the tapetum of anthers at stage 9 of development. Controls were performed using preimmune sera.

MMC, microspore mother cells; Tds, tetrads; T, tapetum; MSp, microspores; PG, pollen grain. Bars = 70 μ m.

templates. Using primers flanking the sites of T-DNA insertions (primer sequences are given in Supplemental Table 1 online), no transcript could be detected for three of the mutant lines (Figure 3B). Moreover, in those insertion lines, no protein accumulation could be detected by immunoblotting protein extracts with specific antibodies (Figure 3C). These data indicate that *tkpr1-1*, *tkpr1-2*, and *tkpr2-1* mutant lines are null alleles of *At4g35420* and *At1g68540*, respectively. In the case of the *tkpr2-2* mutant, T-DNA insertion in the promoter sequence (Figure 3A) strongly reduced gene expression, as shown by low transcript and protein levels detected by RT-PCR and immunoblotting, respectively (Figures 3B and 3C).

Figure 4 illustrates the inflorescence phenotypes of homozygous mutants, showing that the disruption of *TKPR1* and *TKPR2* differently affected plant fertility. The *tkpr1-1* line was sterile and produced no pollen, and its siliques had no seeds, similar to the results reported by Tang et al. (2009). By contrast, *tkpr1-2* displayed a semisterile phenotype; it produced little pollen, and its inflorescences bore three types of siliques: a few that were filled with seeds like the wild type, some that were empty (arrows in Figure 4), and a third category that was bent and contained only a few seeds (arrowheads in Figure 4). Mutations in *TKPR2* did not affect fertility, as illustrated for *tkpr2-1* in Figure 4.

tkpr1-1 anthers and microspores were examined in detail and compared with the wild type at stage 9 of development (Sanders et al., 1999) by transmission electron microscopy (TEM). Figure 5 shows that in wild-type anthers, a thick reticulate exine with distinct baculae and tecta had formed around free, uninucleate

microspores. In mutant flowers, however, the tapetum was highly vacuolated (Figure 5B), and microspores were profoundly affected, with an exine structure that appeared very thin (Figure 5D) and completely disorganized without baculae and tecta (Figure 5H). In contrast with the cytoplasmically dense microspores in wild-type anthers (Figure 5C), *tkpr1-1* microspores at this stage were disorganized, largely devoid of cytoplasm, and showed signs of rupture. Finally, *tkpr1-1* locules contained a fibrillar, electron-dense network (Figure 5F) that was not observed in wild-type anthers and could represent unpolymerized sporopollenin precursors. By contrast, cell walls of wild-type and mutant anthers were similar, with visible superficial cuticle layer (Figures 5I and 5J).

Pollen grains from the other genotypes were examined by fluorescence microscopy after staining with auramine O, a fluorescent dye that reveals exine patterns (Dobritsa et al., 2009a, 2009b). Fluorescence of the few *tkpr1-2* mutant pollen grains that were produced (Figure 6B) was strongly attenuated compared with the wild-type pattern (Figure 6A), whereas only subtle alterations were seen in the exine patterns of *tkpr2-1* pollen whose overall fluorescence intensity was slightly reduced (Figure 6C).

We also examined *tkpr1-2* and *tkpr2-1* pollen grains in detail by scanning electron microscopy (Figures 6D to 6O). Many *tkpr1-2* pollen grains were severely distorted (Figures 6E and 6H), showing large areas where the reticulate exine pattern was no longer apparent (Figures 6K and 6N), and these pollen grains tended to aggregate in comparison to the well-separated wild-type grains (Figures 6E and 6D, respectively). More subtle

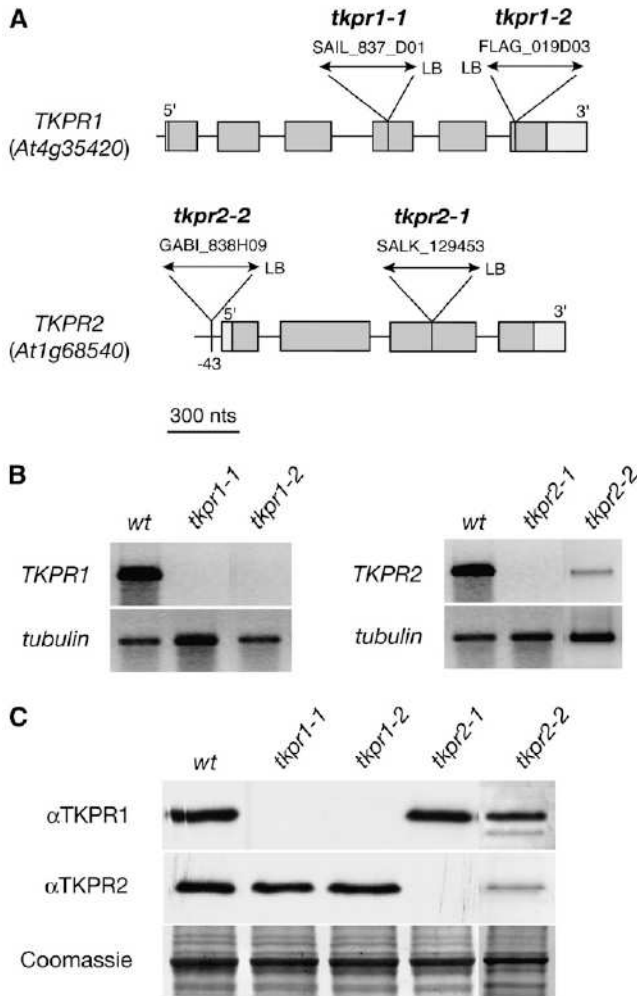


Figure 3. Molecular Characterization of *TKPR1* and *TKPR2* Insertion Alleles.

(A) Positions of T-DNA insertions in the different mutant lines are shown, and for each the position of the left border (LB) is indicated. Boxes denote exons and thin horizontal lines denote introns.

(B) RT-PCR analysis of gene expression in wild-type and mutant flower buds. No amplicon was detectable in *tkpr1-1*, *tkpr1-2*, and *tkpr2-1* samples, whereas a weak signal was recorded in *tkpr2-2* buds, using primers shown in Supplemental Table 1 online. *TUBULIN* transcripts were amplified as a positive control.

(C) Protein accumulation in wild-type and mutant bud extracts was evaluated by immunoblotting with specific antibodies raised against recombinant proteins. No protein accumulation was detected in *tkpr1-1*, *tkpr1-2*, and *tkpr2-1* lines, confirming that gene expression was knocked out. A faint band was detected in the *tkpr2-2* sample, indicating that T-DNA insertion in the promoter sequence (A) knocked down gene expression. Equal loading of protein is shown by Coomassie blue staining of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase.

defects were detected in *tkpr2-1* (arrows in Figure 6F), and higher magnification images showed a few limited areas without a visible exine network (arrow in Figure 6I). At even higher magnification (Figures 6L and 6O), a few spherical protrusions were visible inside and outside the mutant exine tecta. Similar

defects were observed in *tkpr2-2* pollen (see Supplemental Figure 3 online).

Enzymatic Activities of *TKPR1* and *TKPR2* Proteins Produced in *Escherichia coli*

The coding regions of the two putative reductase genes were cloned in a vector that introduced an N-terminal glutathione S-transferase tag and were expressed in *E. coli*. Each recombinant protein was purified by affinity chromatography on glutathione beads (see Supplemental Figure 4 online), used to raise polyclonal antisera, and tested for catalytic activity.

Sequence analysis of *TKPR1* (At4g35420) and *TKPR2* (At1g68540) predicted proteins showed that they both possess consensus NADP/NAD binding motifs (see Supplemental Figure 1 online). Therefore, considering the fact that these two putative oxidoreductase genes are tightly coexpressed with *ACOS5* and the polyketide synthases *PKSA* and *PKSB* in tapetal cells during pollen development (Figures 1 and 2) (de Azevedo Souza et al., 2009; Kim et al., 2010), we examined the possibility that these enzyme activities could function in a common biochemical pathway. Particularly, the tri- and tetraketide compounds produced

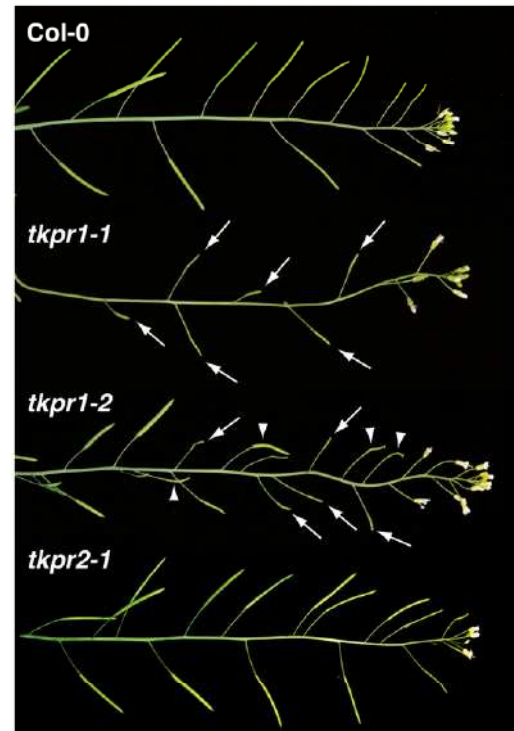


Figure 4. Differential Impacts of *tkpr* Mutations on Plant Fertility.

The inflorescences of different *Arabidopsis* genotypes are shown. Compared with Col-0 wild-type siliques that are filled with seeds, those of *tkpr1-1* are empty (arrows), and this line is sterile. By contrast, *tkpr1-2* inflorescences bear three types of siliques: some are filled with seeds, some are completely empty (arrows), and a third category contains only a few seeds (arrow heads), thus revealing a semisterile phenotype. Mutations in *TKPR2* did not affect fertility, as shown here for *tkpr2-1*.

[See online article for color version of this figure.]

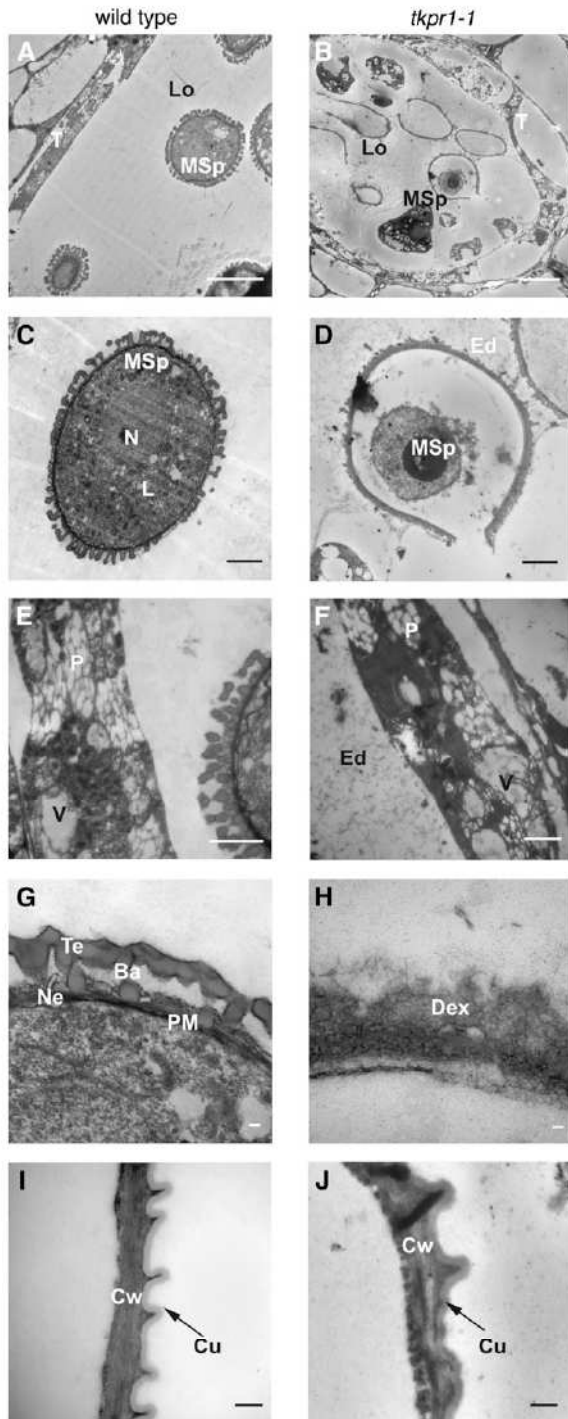


Figure 5. Exine Formation Is Impaired in *tkpr1-1* Anthers.

TEM analysis of sections of anthers and microspores from wild-type (**[A]**, **[C]**, **[E]**, **[G]**, and **[I]**) or *tkpr1-1* (**[B]**, **[D]**, **[F]**, **[H]**, and **[J]**) plants at stage 9 of anther development (Sanders et al., 1999). Details are shown for anther locule (**[A]** and **[B]**), microspore (**[C]** and **[D]**), tapetum (**[E]** and **[F]**), exine (**[G]** and **[H]**), and anther wall (**[I]** and **[J]**). Ba, baculae; Cu, cuticle; Cw, cell wall; Dex, defective exine structure; Ed, electron-dense material; L, lipid droplets; Lo, locule; MSp, microspore;

by PKSA and PKSB through condensation of fatty acyl-CoAs with malonyl-CoA (Kim et al., 2010) bear several chemical functions that are potential targets for reduction reactions.

As shown in Figure 7A (top profile), incubation of PKSB in the presence of palmitoyl-CoA and malonyl-CoA produced tri- and tetraketide α -pyrones with mass-to-charge (m/z) values of 321 and 363, respectively. When recombinant TKPR1 protein and NADPH were added to the PKS incubation medium, the peak of the tetraketide product decreased and a new peak appeared with a m/z value of 365 that is 2 atomic mass units higher than that of the tetraketide substrate ($m/z = 363$), indicating that TKPR1 had catalyzed reduction of the tetraketide α -pyrone. The triketide peak ($m/z = 321$) remained unchanged, and its putative reduced product ($m/z = 323$) was not detected, thus indicating that the triketide α -pyrone is not a substrate for the reductase.

The TKPR2 protein proved even more active, since almost all of the tetraketide α -pyrone had disappeared and was supplanted by the reduced compound of 365 m/z value (Figure 7A) after incubation with enzyme. These results demonstrate that TKPR1 and TKPR2 are reductases active with tetraketide but not triketide α -pyrones as substrates. Moreover, when TKPR1 and TKPR2 were incubated together, no new peak resulting from a double reduction ($m/z = 367$) was recorded. This suggests that both enzymes target the same chemical function in vitro. The occurrence of a carbonyl function borne by the alkyl chain of tetraketide compounds constitutes the major structural difference from triketide products (cf. structures in top profile of Figure 7A). This makes the carbonyl function the most likely target of the reduction reaction that affects only the tetraketide compounds. Moreover, in collision-induced dissociation experiments (Figures 7B to 7D), we observed the presence of fragments at the 125 m/z value in the mass spectrum of reduction reaction products (Figures 7C and 7D) and in the tetraketide substrate (Figure 7B), which is diagnostic for the lactone ring of the tetraketide α -pyrones (Saxena et al., 2003; Rubin-Pitel et al., 2008). Thus, these results suggest that the lactone ring remained unaffected by the reduction reaction. Taken together, these data indicate that both TKPR1 and TKPR2 reduced the carbonyl function of the tetraketide α -pyrones to a secondary alcohol function. Therefore, the proteins encoded by *At4g35420/DRL1* and *At1g68540/CCRL6* were named TKPR1 and TKPR2, respectively.

Because the role of CYP450 hydroxylases in modification of fatty acid sporopollenin precursors has been demonstrated previously (Morant et al., 2007; Dobritsa et al., 2009b), we tested the ability of TKPR to reduce hydroxylated tetraketide α -pyrone compounds. These were generated by first incubating 16-OH palmitic or 12-OH stearic acids with ACOS5, ATP, and CoA. The corresponding CoA esters were then condensed to malonyl CoA using recombinant PKSB (Kim et al., 2010) to yield the hydroxylated tetraketide compounds, which were assayed as TKPR1 and TKPR2 substrates (Figures 8A and 8B). In controls incubated in the absence of NADPH, tri- and tetraketide compounds were

N, nucleus; Ne, nexine; P, plastid filled with plastoglobuli; PM, plasma membrane; T, tapetal cell; Te, tectum; V, vacuole containing electron-dense material. Bars = 10 μm in (**A**) and (**B**), 2 μm in (**C**) to (**F**), 500 nm in (**I**) and (**J**), and 100 nm in (**G**) and (**H**).

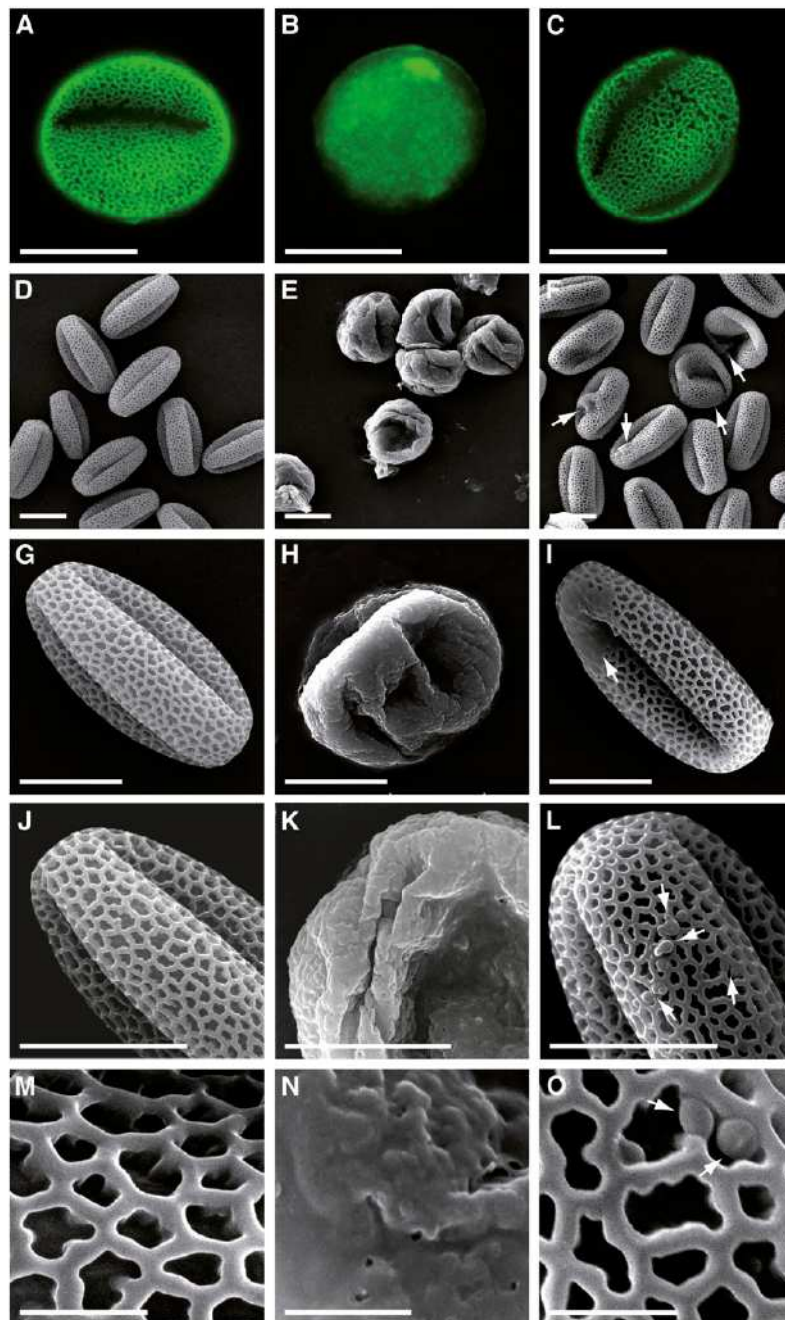


Figure 6. Comparison of Exine Architecture in Wild-Type, *tkpr1-2*, and *tkpr2-1* Pollen.

(A), (D), (G), (J), and (M) Wild-type pollen.

(B), (E), (H), (K), and (N) *tkpr1-2* pollen.

(C), (F), (I), (L), and (O) *tkpr2-1* pollen; arrows indicate exine defects.

(A) to (C) Epifluorescence microscope images of wild-type and mutant pollen. Pollen was stained with the fluorescent dye auramine O and visualized using fluorescein isothiocyanate settings.

(D) to (O) Scanning electron micrographs of wild-type and mutant pollen grains.

Bars = 10 μm in (A) to (L) and 2 μm in (M) to (O).

[See online article for color version of this figure.]

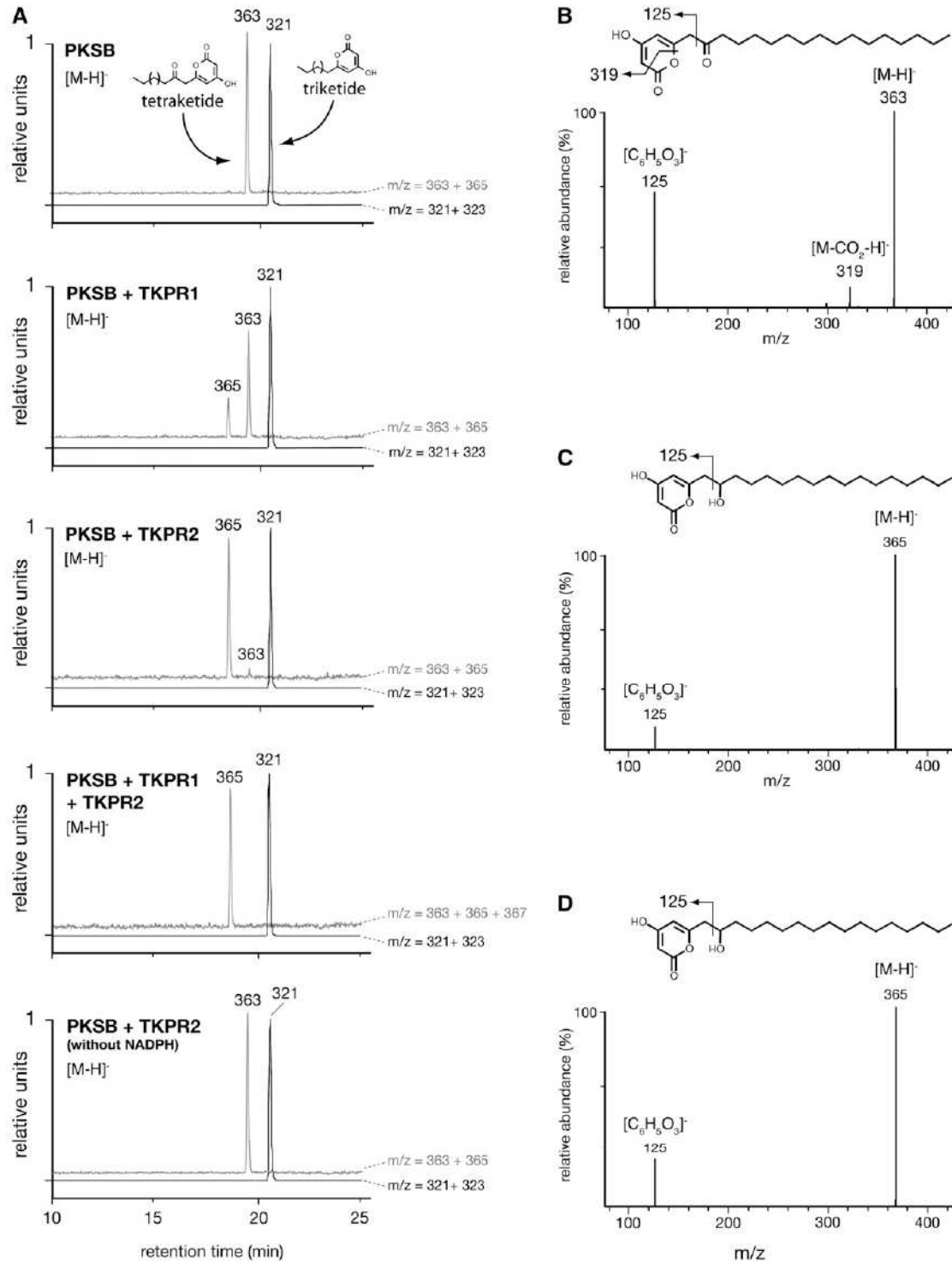


Figure 7. Identification of TKPR Reaction Products by LC-MS/MS.

Tri- and tetraketide compounds were synthesized by PKSB in the presence of palmitoyl-CoA and malonyl-CoA and incubated with recombinant TKPR enzymes. Reaction products were separated by UPLC and identified by negative electrospray ionization (ESI) mass spectrometry.

(A) Compounds were detected by their m/z values. Black curves show ions corresponding to the triketide compound and its putative reduction product (m/z of 321 and 323, respectively); gray curves show ions corresponding to the tetraketide compound and its putative reduction product (m/z of 363 and 365, respectively). The 321 (triketide) and 363 (tetraketide) peaks of the control incubated without NADPH (bottom profile) have been normalized to 1.

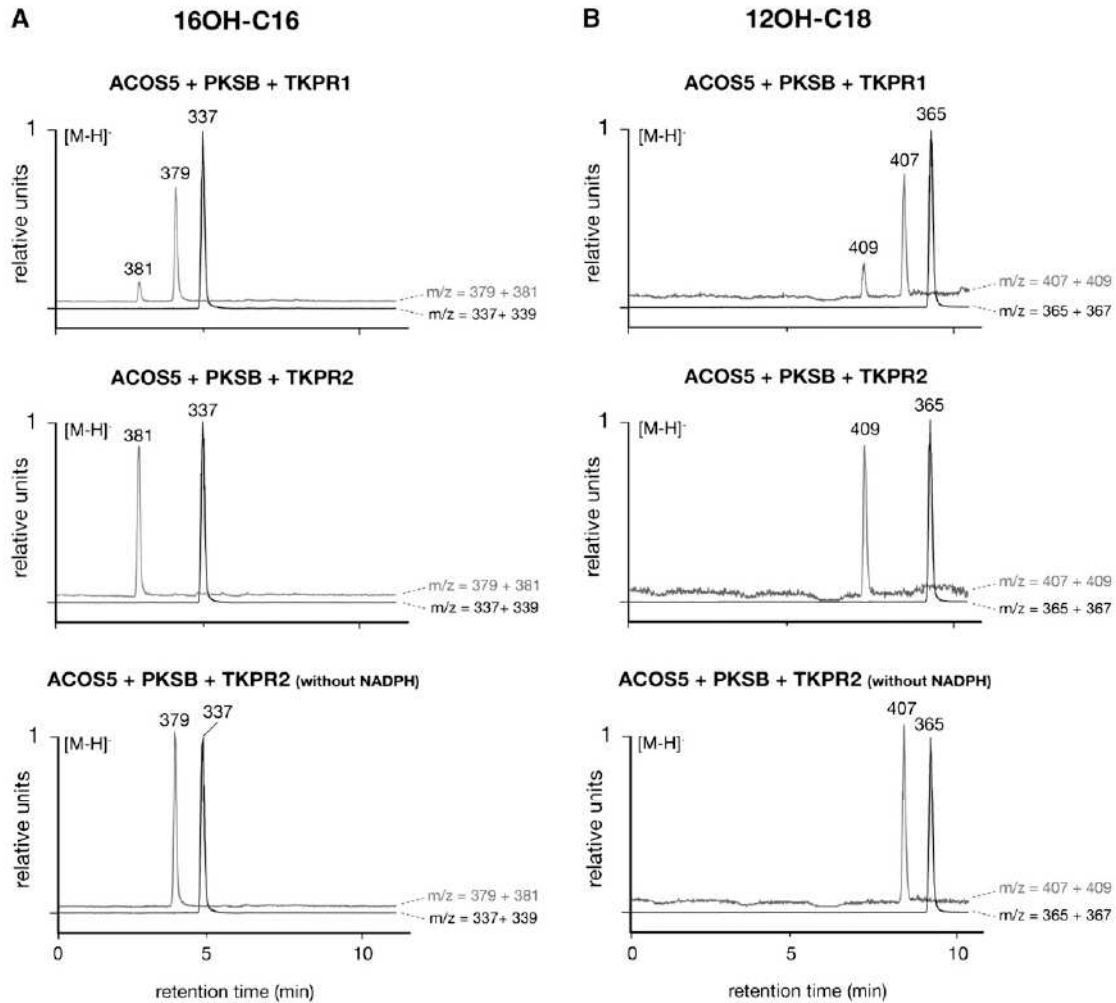


Figure 8. ACOS5, PKS, and TKPR Activities Define a Sequence of Biosynthetic Reactions.

The 16-hydroxy palmitic (**A**) and 12-hydroxy stearic (**B**) acids were incubated successively with ACOS5, PKS, and TKPR1 or TKPR2 recombinant enzymes (see Methods). Putative reaction products were detected by their m/z values after separation by UPLC and negative electrospray ionization (ESI) mass spectrometry. Black curves show ion species corresponding to triketides, and their putative reduction products and gray curves show ion species from tetraketide substrates and products. Controls for the reduction reaction were run without NADPH and gave rise to tri- and tetraketide ions that were normalized to 1.

produced by PKS enzyme (bottom profiles in Figures 8A and 8B). When TKPR incubations were performed in the presence of NADPH, new peaks were detected that corresponded to reduced tetraketides derived from 16-OH palmitic and 12-OH stearic acids (species of 381 and 409 m/z values, respectively). It is noteworthy that TKPR2 catalyzed the complete reduction of

the tetraketide substrates, whereas TKPR1 was less active, similar to results obtained using palmitoyl-CoA as substrate (Figure 7A). Altogether, these results show that ACOS5, PKS, and TKPR activities catalyze a series of biosynthetic reactions yielding hydroxylated tetraketide compounds that serve as sporopollenin precursors.

Figure 7. (continued).

Only the tetraketide compound was substrate for TKPR1 and TKPR2. No product corresponding to a double reduction of the tetraketide substrate ($m/z = 367$) was detected when TKPR1 and TKPR2 were incubated together.

(B) Fragmentation pattern of $[M-H]^-$ ion of the tetraketide substrate ($m/z = 363$) and putative fragmentation scheme of the molecule.

(C) Fragmentation pattern of $[M-H]^-$ ion of the reduced product obtained after incubation with TKPR1 and its putative fragmentation scheme.

(D) Fragmentation pattern of $[M-H]^-$ ion of the reaction product of TKPR2 is identical to that of TKPR1 reaction product **(C)**, thus indicating that both enzymes catalyze the reduction of the carbonyl function borne by the aliphatic chain of the tetraketide compound.

TKPR Proteins Localize to Different Cellular Compartments

To investigate the cellular localization of TKPR1 and TKPR2 proteins, translational fusions upstream to enhanced green fluorescent protein (eGFP) and placed under the control of the cauliflower mosaic virus 35S promoter (p35S:TKPR1/2-eGFP) were generated. The constructs were transiently expressed in *Nicotiana benthamiana* leaves, together with a reporter construct of an endoplasmic reticulum (ER) marker (mRFP-HDEL). As illustrated in Figure 9, observations by confocal microscopy showed that the two TKPR fusions localize to different cellular compartments. The TKPR1-eGFP fluorescence (Figure 9A) delineates the periphery of epidermal cells. At higher magnification, most of the TKPR1-eGFP fluorescence pattern (Figure 9C) coincides with the reticulate network of mRFP-HDEL that is typical of ER localization (Figure 9E) (Robinson et al., 2007). These data indicate that TKPR1 enzyme is, at least in part, associated with ER. By contrast, TKPR2-eGFP fluorescence that is also located in the cell periphery (Figure 9B) appears, at higher magnification, clearly distinct from the typical reticulate pattern of the ER marker (cf. green and red fluorescence patterns in Figures 9D and 9F, respectively), with TKPR2-eGFP diffuse fluorescence (Figure 9D) being reminiscent of a cytoplasm labeling. Therefore, TKPR2 enzyme is primarily cytosolic and not associated with ER as TKPR1.

Phylogenetic Analysis of TKPR Genes

TKPR1 and TKPR2 belong to a gene superfamily that includes members of mammalian, bacterial, and plant origins (see Supplemental Figure 1 online) (Baker et al., 1990; Baker and Blasco, 1992; Lacombe et al., 1997). Plant family members whose functions are unknown have been referred to as *DRL* (Tang et al., 2009) and *CCR-like* (Hamberger et al., 2007) since the functions of *DFR/TT3* in anthocyanin synthesis and *CCR* in lignin biosynthesis had been characterized several years ago (Shirley et al., 1992; Lacombe et al., 1997). *ANTHOCYANIDIN REDUCTASE (ANR)*, encoding another flavonoid biosynthetic enzyme (Xie et al., 2003), constitutes another clade of the family (Figure 10).

Phylogenetic analysis showed that TKPR1 and TKPR2 define two new clades of plant reductase sequences, formerly annotated as *DRL* and *CCRL* genes, distinct from the *DFR*, *ANR*, and *CCR* clades (Figure 10). These two new clades include homologs from several plant species, ranging from the moss *Physcomitrella patens* to various angiosperms. Strikingly, most of the species examined possess a single homolog in each clade. This indicates that these genes appeared early in evolution and were likely present in a common land plant ancestor (Figure 10; see the list of genes in Supplemental Table 2 online). As previously reported, *Arabidopsis ACOS5*, *PKSA*, and *PKSB* genes show similar patterns of phylogenetic conservation (de Azevedo Souza et al., 2009; Kim et al., 2010), and, like *ACOS5*, *PKSA*, and *PKSB* homologs, TKPR homologs are expressed in male organs of poplar (*Populus* spp) and rice (*Oryza sativa*). These results suggest a conservation of the biosynthetic pathway involving *ACOS5*, *PKS*, and TKPR activities that leads to sporopollenin precursors in land plants.

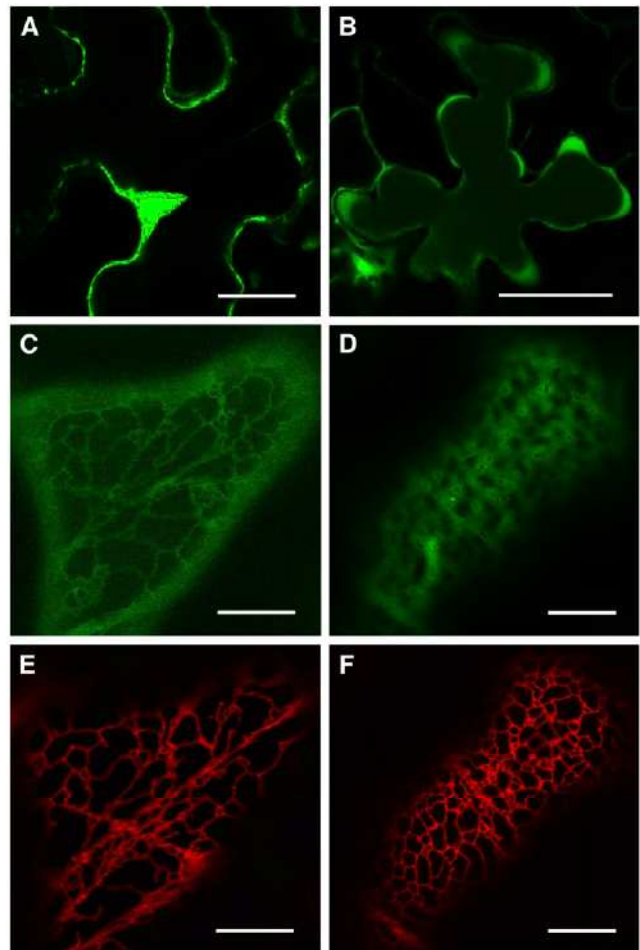


Figure 9. Expression of Fluorescent Fusion Proteins Reveals Distinct Subcellular Localizations for TKPR1 and TKPR2.

TKPR1/2-eGFP and mRFP-HDEL (ER marker protein) constructs were transiently expressed in *N. benthamiana* leaves by agrotransformation and observed by confocal laser scanning microscopy. eGFP fluorescence ([A] to [D]); mRFP fluorescence ([E] and [F]). TKPR1-eGFP fluorescence is detected at the periphery of epidermal cells (A). At higher magnification, a considerable part of TKPR1-eGFP fluorescence pattern (C) coincides with the reticulate network of the ER marker (E), thus revealing that TKPR1 is associated with ER. TKPR2-eGFP fluorescence (B) is located in cell cytoplasm and, at higher magnification (D), is clearly distinct from the reticulate pattern of the ER marker (F). Thus, it is typical of a cytosolic localization. Bars = 40 μ m in (A) and (B) and 10 μ m in (C) to (F).

DISCUSSION

Previously Unknown Gene Functions Required for Pollen Cell Wall Biogenesis

Although it is one of the most robust plant biopolymers and of central importance to plant reproductive success, the structure of sporopollenin, the main constituent of exine, is still poorly

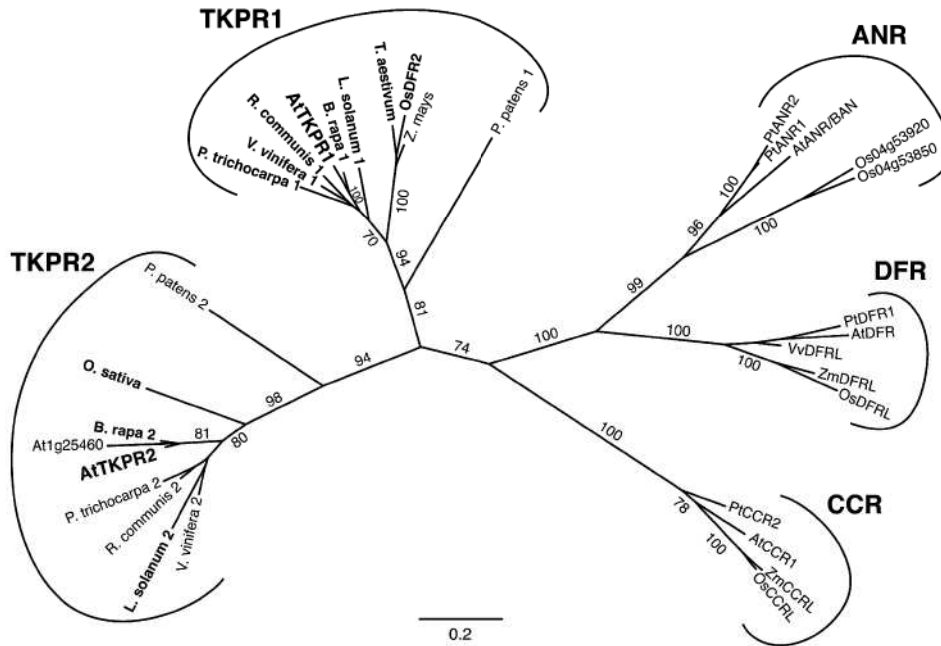


Figure 10. Phylogenetic Analysis of Selected TKPR, CCR, ANR, and DFR Protein Sequences.

Sequences from *Arabidopsis*, poplar, rice, *Physcomitrella*, *Vitis*, wheat (*Triticum aestivum*), maize (*Zea mays*), soybean (*Glycine max*), *Nicotiana*, tomato (*Solanum lycopersicum*), *Ricinus*, *Brassica*, and *Sorghum* were aligned and used to construct an unrooted maximum likelihood tree using PhyML 3.0 and FigTree v.1.2.3. Bootstrap values (1000 replicates) above 70% are given on branches. Proteins that are expressed in flower tissues (as inferred from EST libraries or published data) are indicated in bold. Genes and expression data used in this analysis are given in Supplemental Table 2 online, and the sequence alignment is available in Supplemental Data Set 1 online. Bar = 0.2 amino acid substitutions.

understood. Chemical analysis (Rozema et al., 2001; Bubert et al., 2002; Ahlers et al., 2003) and genetic and biochemical studies (Morant et al., 2007; de Azevedo Souza et al., 2009) have demonstrated the presence of lipidic and phenolic units in the sporopollenin polymer. The isolation of numerous mutants affected in exine synthesis has shown, on the other hand, that a large number of genes expressed in the anther tissues participate in the formation of the pollen cell wall, thus suggesting a high degree of complexity of the underlying processes. Here and in the companion article (Kim et al., 2010), we show the contribution of enzymes encoded by four metabolic genes acting downstream of the fatty acyl-CoA synthetase *ACOS5* that produces fatty acyl-CoA esters as central intermediates in sporopollenin biosynthesis (de Azevedo Souza et al., 2009). Two polyketide synthases encoded by *PKSA* and *PKSB* catalyze the synthesis of α -pyrone products by decarboxylative condensation of the fatty acyl-CoA esters with malonyl-CoA (Kim et al., 2010), and two reductases (*DRL1*/*TKPR1* and *CCRL6*/*TKPR2*) were found to be active on the tetraketide products produced by *PKSA* and *PKSB* activities (Figures 7 and 8). *TKPR* activity creates a new alcohol function whose biosynthetic origin is thus distinct from those of the hydroxyl groups introduced in ω - and in-chain positions of fatty acids by *CYP450* enzymes (Morant et al., 2007; Dobritsa et al., 2009b). Our data indicate that polyhydroxylated long-chain α -pyrones are building units of sporopollenin, thus adding a new function to the polyketide class of natural compounds that exhibits an amazing functional diversity (Hertweck, 2009).

Defects in genes that are directly associated with sporopollenin synthesis have strikingly different impacts on pollen development: the *acos5* mutant fails to produce viable pollen (de Azevedo Souza et al., 2009) similar to the *tkpr1-1* mutant (Figure 5; Tang et al., 2009). Another allele, *tkpr1-2*, produced pollen severely affected in exine formation (Figure 6), whereas *tkpr2-1* and *tkpr2-2* lines were fertile and produced pollen grains exhibiting only slightly modified exine patterns (Figure 6; see Supplemental Figure 3 online). The differential impacts of *TKPR1* (*DRL1*) and *TKPR2* inactivation on pollen development could not have been anticipated from biochemical data since both *TKPR1* and *TKPR2* proteins have similar reduction activities in vitro on the tetraketide α -pyrones produced by *PKSA* and *PKSB*, with *TKPR2* being the most active enzyme (Figures 7 and 8). These results suggest that in vivo, the two reductases do not fulfill exactly the same functions. The distinct subcellular localizations of *TKPR1* and *TKPR2* that have been evidenced in Figure 9 may support these conclusions. *TKPR1* appeared preferentially localized to the ER, as also shown for *PKSA* and *PKSB* (Kim et al., 2010). With *CYP703A2* and *CYP704B1* hydroxylases being putatively localized to the ER, they may form, with *PKSs* and *TKPR1*, metabolons located in the ER and yielding polyhydroxylated α -pyrones. In this model, cytoplasmic *TKPR2* enzyme might be preferentially active on distinct substrates released in the cytosol. In situ hybridization experiments showed that *TKPR1* and *TKPR2* have similar temporal and spatial patterns of gene expression but that *TKPR1* expression is initiated at an earlier

stage of anther development (Figure 2). Immunodetection of the proteins with specific antibodies in flower tissues at various stages of development (Figure 1) showed distinct kinetics of TKPR protein accumulation, with TKPR1 accumulating more transiently than TKPR2. The severe phenotype of *tkpr1* pollen, fully sterile or poorly fertile depending on the allele, suggests that TKPR1-catalyzed polyketide reduction is essential at an early step of exine formation, possibly for initiating the reticulated exine pattern. It is noteworthy that tapetal cells of *tkpr1-1* mutant appeared highly vacuolated compared with the wild type (Figure 5), thus suggesting a role of TKPR1 expression in normal tapetum development. We were unable to demonstrate a clear differential accumulation of TKPR1 and TKPR2 proteins at early stages of anther development due to too weak immunological signals (data not shown).

It is interesting that, in parallel with these apparent *in vivo* differences in TKPR function, the two PKS enzymes that supply TKPR substrates may also have slightly different *in vivo* functions, despite their identical *in vitro* activities (Kim et al., 2010). Our results are in agreement with the hypothesis that, *in vivo*, pairs of PKS and TKPR enzymes work together to specify particular structural attributes of the sporopollenin polymer, and with the model whereby the TKPR1/PKSB pair plays an

essential role in polyhydroxylated long-chain α -pyrones biosynthesis at a critical early stage of exine deposition.

It is noteworthy here that the sequential action of ACOS5 (fatty acid acyl-CoA synthase), PKS, and TKPR enzymes on fatty acid substrates ends up with the chemical reduction of the carboxylic function of the initial fatty acid into a secondary alcohol function in the tetraketide α -pyrone molecule. This new hydroxyl function is then prone to form ether or ester linkages in the highly complex sporopollenin polymer as proposed for hydroxyl groups introduced by the P450 hydroxylases (Morant et al., 2007; Dobritsa et al., 2009b). Since hydroxy fatty acids have been demonstrated to be substrates of ACOS5, PKS, and TKPR activities acting sequentially to synthesize sporopollenin units (Figure 8), the network of ester and ether interlinkages in the sporopollenin polymer could be particularly dense, resulting in an unparalleled resistance to degradation.

The Sporopollenin Biosynthetic Pathway Is Conserved in Land Plants

It is believed that the high level of resistance of the pollen cell wall to biotic and abiotic stresses has played a pivotal role in the

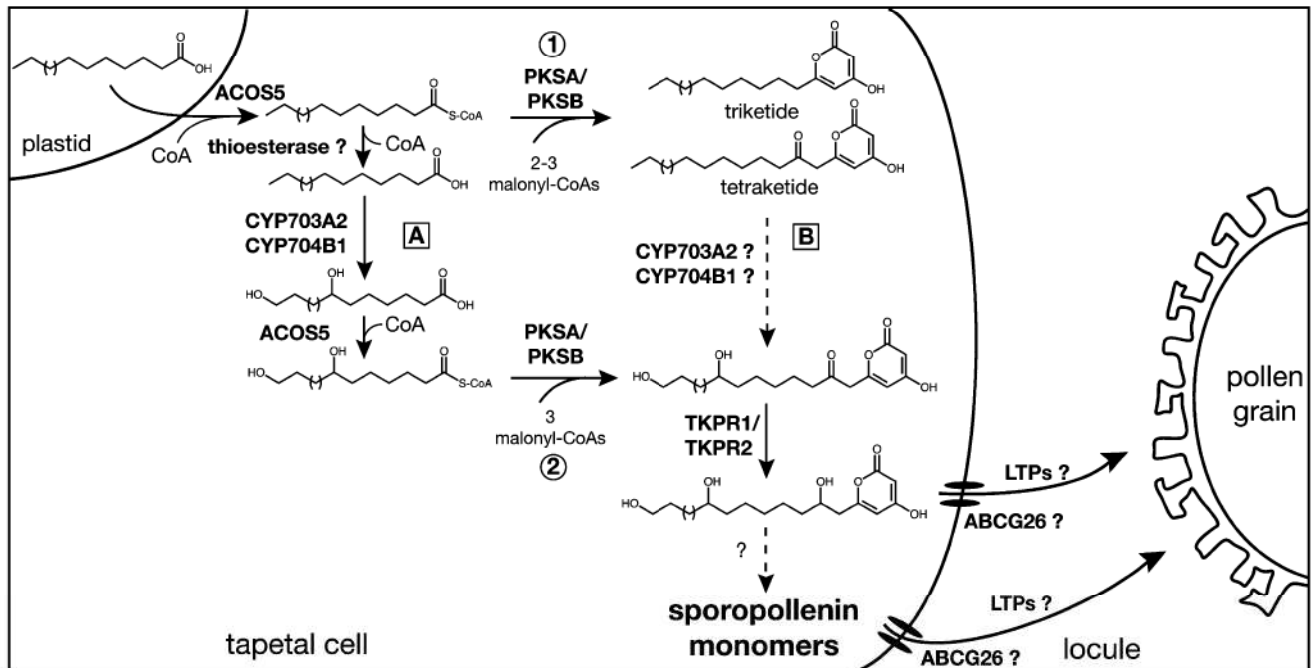


Figure 11. A Putative Scheme of Sporopollenin Biosynthesis.

Fatty acids synthesized in plastids are esterified to CoA by ACOS5 and then extended to triketide and tetraketide products by PKSs that catalyze the condensation to malonyl CoA. Extension of fatty acyl-CoAs by PKSs may take place either directly (route 1) or after hydroxylation by CYP450s (route 2). CYP450 hydroxylases have been shown to have free fatty acids as substrates, thus implicating CoA ester hydrolysis by a putative thioesterase and regeneration of the CoA esters by ACOS5 upstream and downstream of the hydroxylation step, respectively (route A). However, hydroxyl groups might be putatively introduced by CYP450s at the tetraketide level (route B) before the reduction of the carbonyl function by TKPRs. Resulting polyhydroxylated tetraketide compounds may then be exported by ABCG26 and lipid transfer proteins (LTPs) to the locule as sporopollenin building units or further processed before transport and polymerization in the pollen wall.

conquest of land by plants (Rozema et al., 2001; Blackmore et al., 2007). Indeed, the widespread occurrence of sporopollenin in pollen grains and spores of land plant lineages indicates the conservation of an ancient biosynthetic pathway during plant evolution. In agreement with this assumption, it has been noticed that genes involved in exine formation, such as *ACOS5*, *CYP703A2*, *CYP704B1*, and *PKSA/PKSB*, are conserved from moss to gymnosperms and angiosperms (Morant et al., 2007; de Azevedo Souza et al., 2009; Dobritsa et al., 2009b; Kim et al., 2010). In the case of *PKSA* and *PKSB*, several putative orthologs are specifically expressed in anthers or tapetal cells of various plant species (Kim et al., 2010).

TKPR1 (DRL1) and TKPR2 belong to a superfamily of reductases/dehydrogenases that harbors an N-terminal putative NAD (P)H binding domain called a Rossmann fold and includes DFR, ANR, and CCR involved in flavonoid and lignin biosynthesis (Shirley et al., 1992; Lacombe et al., 1997; Yau et al., 2005; Tang et al., 2009). The reductase/dehydrogenase gene family appears widespread in living organisms since it also includes cholesterol dehydrogenases and UDP-galactose epimerases from bacteria and 3β -hydroxysteroid dehydrogenases of mammalian origin (see Supplemental Figure 1 online) (Baker et al., 1990; Baker and Blasco, 1992). Moreover, the overall structural resemblance of the gene family members indicates that they may be derived from a common ancestor (Baker et al., 1990; Baker and Blasco, 1992; Lacombe et al., 1997; Yau et al., 2005; Tang et al., 2009).

Our results show that TKPR2, a newly discovered reductase, and TKPR1/DRL1 (Tang et al., 2009) are coexpressed in *Arabidopsis* anthers (Figure 2) and belong to the same reductase/dehydrogenase family. Phylogenetic analysis showed that *TKPR1* and *TKPR2* genes cluster in distinct clades with homologs from various plant species (Figure 10). Besides *Arabidopsis*, poplar, rice, grape (*Vitis vinifera*), sorghum (*Sorghum bicolor*), and *Physcomitrella* possess gene members clustering in each clade. As observed for *PKSA* and *PKSB* genes (Kim et al., 2010), these *TKPR* orthologs appear to be specifically expressed during anther development. In the case of *Arabidopsis* (this work), poplar (Wilkins et al., 2009), and rice (Yau et al., 2005), a member of each clade was found to be expressed in male reproductive organs, thus suggesting that the functions of the encoded reductases are not fully redundant, even though those of *Arabidopsis* have been shown here to catalyze the same reaction *in vitro*. Thus, our work shows that, like the *Arabidopsis* *ACOS5*, *CYP703A2*, *CYP704B1*, and *PKSA/PKSB* genes, *TKPR1* and *TKPR2* represent ancient conserved genes present in all land plants surveyed to date. The functions of these enzymes revealed by this and other work (Morant et al., 2007; de Azevedo Souza et al., 2009; Dobritsa et al., 2009b; Kim et al., 2010) strongly suggest that they participate in a conserved biochemical pathway that generates sporopollenin precursors.

A Model for Sporopollenin α -Pyrone Monomer Synthesis

The results described here and in the companion article (Kim et al., 2010), provide compelling new data illuminating a previously undiscovered, conserved metabolic pathway involving fatty acyl-CoA extension and reduction steps catalyzed by

PKS and *TKPR* enzymes, respectively, which leads to polyketide α -pyrone compounds that are shown here to be essential sporopollenin precursors. In Figure 11, we propose a working model that includes different possibilities for the sequential actions of the enzymes involved in sporopollenin unit synthesis. After CoA ester formation by *ACOS5*, *PKSs* can catalyze acyl-CoA extension to tri- and tetraketide α -pyrones (Figure 11, route 1). *CYP450* hydroxylases have been shown to be active on free fatty acids (Morant et al., 2007; Dobritsa et al., 2009b), thus implicating putative thioesterase and CoA ester regeneration steps upstream and downstream of the hydroxylation step as shown on the left side of the scheme (Figure 11, route A). We have shown that hydroxy fatty acyl-CoAs are the most efficient substrates for *PKSA* and *PKSB*, consistent with an ER localization (Kim et al., 2010), and can yield various hydroxy polyketides (route 2). These latter compounds might also arise from the hydroxylation of the alkyl α -pyrones by *CYP450s* (route B), but this possibility remains to be examined experimentally. Finally, reduction of the carbonyl function of the hydroxy tetraketide α -pyrones by *TKPRs* gives rise to an additional hydroxyl function in the alkyl chain of the polyketide products, generating more highly hydroxylated polyketides that are proposed constituents of a sporopollenin polymer highly cross-linked by ester and ether bonds. The association of *TKPR1* with ER, where hydroxylation by *P450s* takes place, may be important in this respect. It remains to be determined whether these hydroxylated polyketides are direct sporopollenin monomers exported into the lumen by the possible actions of ABCG26, a putative ATP binding cassette transporter of sporopollenin precursors in *Arabidopsis* (Quilichini et al., 2010), and lipid transfer proteins (as has been suggested in rice; Zhang et al., 2010) or if other unknown modifications occur before export and polymerization in the pollen cell wall (Figure 11). Examination of the metabolic changes in the sporopollenin mutants that we have characterized should shed more light on the complex molecular network leading to sporopollenin biosynthesis.

METHODS

Plant Material and Growth Conditions

Arabidopsis thaliana Columbia (Col-0) and Wassilewskija ecotypes were grown as follows. For segregation analysis and transformant selection, seeds were surface sterilized, and after a cold treatment (2 d at 4°C in the dark) were sown on Murashige and Skoog medium supplemented with adequate antibiotic and germinated at 20°C under 12 h 70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fluorescent lighting. Twelve days later, the plants were subcultured on soil and transferred to growth chambers with light/dark cycles of 16 h/8 h for 2 weeks and then to the greenhouse. Homozygous seeds were sown and grown directly on soil. *Nicotiana benthamiana* plants were grown in the greenhouse under the same conditions. T-DNA insertion mutants were obtained from SALK, SAIL (Alonso et al., 2003), and Gabi-Kat (Rosso et al., 2003) collections via the Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre and from FLAGdb/FST at Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) Versailles (Samson et al., 2002). The lines used in this study were SAIL_837_D01 and FLAG_019D03 for *tkpr1* and GABI_838H09 and SALK_129453 for *tkpr2*. In progeny, homozygous insertion lines were identified by PCR using gene-specific and vector-specific primers (see Supplemental Table 1 online).

Phylogenetic Studies

Putative TKPR orthologs were searched using the TBLASTN algorithm (blosum62 matrix) (Altschul et al., 1990) in plant EST databases (the National Center for Biotechnology Information, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, and Dana-Farber Cancer Institute Plant Gene Index, <http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/plant.html>). Translated sequences of candidate genes were aligned using the MUSCLE 3.7 program (Edgar, 2004) with a maximum number of 16 iterations and then curated by removing gap positions. The resulting multiple sequence alignment is available as Supplemental Data Set 1 online. Sources of amino acid sequences used to generate these alignments are given in Supplemental Table 2 online. A bootstrap maximum likelihood tree was constructed using PhyML 3.0 (Guindon and Gascuel, 2003) with the WGA amino acid substitution model. The tree was edited using FigTree v.1.2.3. Bootstrap values are based on 1000 iterations.

Microscopy

For fluorescence microscopy, pollen was stained with 0.01% auramine O in water for 5 min, washed twice with water, and examined with a Nikon E800 microscope using fluorescein isothiocyanate settings. For electron scanning microscopy, pollen grains were coated with gold particles (S150A sputter coater; Edwards High Vacuum) for 3 min at 50 mV and viewed with a Philips XL30 ESEM (FEI) under high vacuum conditions and at 20 to 30 kV. The microscope was equipped with a Thornley-Everhart secondary electron detector and a PGT Spirit EDX microanalysis system (Princeton Gamma Tech). For TEM, tissue fixation, embedding, sectioning, and visualization were performed in the UBC Bioimaging Facility as described by Kim et al. (2010). For subcellular localization of TKPR-eGFP fusions, the cDNA of TKPR1/2 was PCR amplified using the primer pairs given in Supplemental Table 1 online and inserted into the expression vector pB7FWG2 (VIB) using the Gateway cloning system (Invitrogen) to obtain C-terminal fusions with eGFP. The mRFP fluorescent protein with the C-terminal extension-HDEL served as an ER marker protein (Robinson et al., 2007). Both constructs allow the in planta expression of proteins under the control of the constitutive cauliflower mosaic virus double 35S promoter. Leaves of 4-week-old *N. benthamiana* plants were agroinfiltrated and subsequently placed in a growth chamber for 96 h. Fluorescence microscopy was performed using a LSM 700 confocal laser microscope (Carl Zeiss). Two lasers were used as the excitation sources at 488 and 555 nm, and light emission was detected with the short-pass filter at 613 nm for RFP constructs and short-pass filter at 515 nm for GFP constructs. Images were recorded and processed using ZEN 2009 (Carl Zeiss).

RT-PCR

Reverse transcription and quantitative RT-PCR analysis of *TKPR* expression was performed as described for *PKS* genes (Kim et al., 2010) using forward and reverse primers shown in Supplemental Table 1 online. In the case of quantitative RT-PCR, *ACTIN2* (At3g18780) was used as a reference gene. For knockout mutant validation, *TUBULIN3* (At5g62700) was used as a positive control of RT-PCR.

Production of Recombinant Proteins and Specific Antibodies and Immunological Techniques

The methods and procedures were as described in the companion article (Kim et al., 2010). Briefly, full coding sequences were cloned in pGEX-KG and expressed in *E. coli*. Recombinant proteins were purified on glutathione agarose and analyzed on SDS-PAGE gels as illustrated in Supplemental Figure 4 online. Purified preparations were used to raise polyclonal antibodies in rabbits. Antibody specificity for each TKPR

protein was enhanced by preincubation with an acetonic powder of *Arabidopsis* leaves and then with the other recombinant TKPR protein. Antibody specificity was checked against purified recombinant proteins on immunoblots (see Supplemental Figure 5 online). Bud tissues were fixed, dehydrated in an ethanol series, and embedded in paraplast. Ten-micrometer-thick sections were incubated with a 200-fold dilution of the serum. After washing and incubation with phosphatase-labeled goat anti-rabbit antibody, phosphatase activity was revealed with FastRed. Sections were observed under a Nikon E800 microscope.

In Situ Hybridization

Methods used for probe synthesis, tissue fixation and hybridization were as described by Kim et al. (2010). Digoxigenin-labeled probes were synthesized by PCR using gene-specific primers (see Supplemental Table 1 online). Probe specificity was checked by hybridization to PCR-amplified cDNA of *TKPR1* and *TKPR2* as shown in Supplemental Figure 6 online.

Chemical Synthesis of Fatty Acyl-CoA Esters

Palmitoyl-CoA and stearoyl-CoA esters were chemically prepared from palmitic and stearic acids according to published procedures (Funa et al., 2006). CoA ester preparations were purified by reverse-phase HPLC and characterized by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis.

Enzyme Activity Assays

ACOS5 Activity

In a volume of 100 μ L, 5 μ g of recombinant protein was incubated in 60 mM sodium phosphate buffer containing 10 mM $MgCl_2$, 5 mM ATP, 2.5 mM DDT, 1 mM CoASH, and 0.1 mM fatty acid (from a 1 mM stock solution in 0.1% Triton X-100). The mixture was incubated at 30°C. For ACOS5 activity measurements, the reaction was stopped by addition of 10 μ L of 1 N HCl and, after extraction of residual fatty acid with ethyl acetate, CoA esters were analyzed by LC-MS/MS. ACOS5 activity was used for the biosynthesis of various fatty acyl-CoA esters that were tested as PKS substrates.

PKS Activity

When chemically synthesized CoA esters were used, 5 μ g of enzyme was incubated in 100 μ L volume containing 100 mM sodium phosphate, pH 7.0, 0.1 mM fatty acyl-CoA ester, and 0.1 mM malonyl-CoA. PKS activity was evaluated as described by Kim et al. (2010) and used to synthesize the substrates of TKPRs. PKS activity was also assayed with various fatty acyl-CoA esters synthesized by ACOS5. To that aim, after 15 min ACOS5 incubation, 5 μ g of PKSA or PKSB protein were added to the incubation medium together with malonyl-CoA and incubated for an additional hour. Activity was measured as for chemically synthesized fatty acyl-CoA substrates. A variety of tetraketide compounds synthesized by PKS were tested as substrates of TKPRs.

TKPR Activity

To evaluate reductase activity on PKS reaction products, PKSs and TKPRs (5 μ g each), 0.1 mM malonyl-CoA, and 1 mM NADPH were added to the reaction mixture at the end of 15 min of ACOS5 incubation, and incubation was carried out for one additional hour. The reaction was stopped with 10 μ L 1 N HCl, and products were extracted with 500 μ L ethyl acetate. Solvent was evaporated under nitrogen stream, and the reaction products were dissolved in 100 μ L methanol and analyzed by LC-MS/MS.

Characterization of Reaction Products by LC-MS/MS

Reaction products were resolved and identified as described by Kim et al. (2010). For analysis, an Acquity UPLC system (Waters) coupled to a Quattro Premier XE triple quadrupole MS system (Waters Micromass) was used. Full-scan, selected ion recording, daughter scan, and multiple reaction monitoring modes were used for mass analysis.

Accession Numbers

Sequence data from this article can be found in the Arabidopsis Genome Initiative or GenBank/EMBL databases under the following accession numbers: At4g35420 (*TKPR1*), At1g68540 (*TKPR2*), At1g02050 (*PKSA*), At4g34850 (*PKSB*), At1g62940 (*ACOS5*), At3g18780 (*ACTIN2*), and At5g62700 (*TUBULIN3*).

Supplemental Data

The following materials are available in the online version of this article.

Supplemental Figure 1. Multiple Alignment of Oxidoreductase Predicted Protein Sequences Obtained with ClustalW.

Supplemental Figure 2. Developmental Expression Profiles of *TKPR1*, *TKPR2*, and *At1g25460*.

Supplemental Figure 3. Comparison of Exine Architecture in Wild-Type and *tkpr2-2* Pollen.

Supplemental Figure 4. Analysis of Recombinant Protein Preparations at Different Steps of Purification.

Supplemental Figure 5. Characterization of Antibodies Raised against TKPR Proteins.

Supplemental Figure 6. Specificity of TKPR Nucleotidic Probes.

Supplemental Table 1. Primers Used in Cloning, Genotyping, and RT-PCR Experiments.

Supplemental Table 2. Genes and Expression Data Used for Constructing the Phylogenetic Tree of Figure 10.

Supplemental Data Set 1. Sequence Alignments Used for Constructing the Phylogenetic Tree Shown in Figure 10.

ACKNOWLEDGMENTS

The assistance of D. Meyer (Institut de Biologie Moléculaire des Plantes) in histochemical analysis, M. Alioua (Institut de Biologie Moléculaire des Plantes) in DNA sequencing, and M. Erhardt (Institut de Biologie Moléculaire des Plantes) for TEM is gratefully acknowledged. We thank J.-H. Lignot (Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, Strasbourg) for kind help with scanning electron microscopy, C. Ritzenthaler (Institut de Biologie Moléculaire des Plantes) for help with confocal microscopy, and D. Debayle (Institut de Biologie Moléculaire des Plantes) for assistance in LC-MS/MS analysis at the initial stages of the work. We also thank Michael Friedmann (University of British Columbia) for helpful comments and advice and the University of British Columbia Bioimaging Facility for technical assistance and advice. We are grateful to the Salk Genomic Analysis Laboratory (La Jolla, CA), INRA Versailles (France), and Bielefeld University (Germany) for providing the T-DNA mutants and to the Nottingham Arabidopsis Stock Centre for distributing the seeds. The UPLC-MS/MS system was cofinanced by the Centre National de la Recherche Scientifique, the Université de Strasbourg, the Région Alsace, INRA, and Tepral Company. This work was supported by doctoral fellowships of the Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche to E.G. and B.L., and by a Natural Sciences and Engineering Research Council Discovery grant to C.J.D.

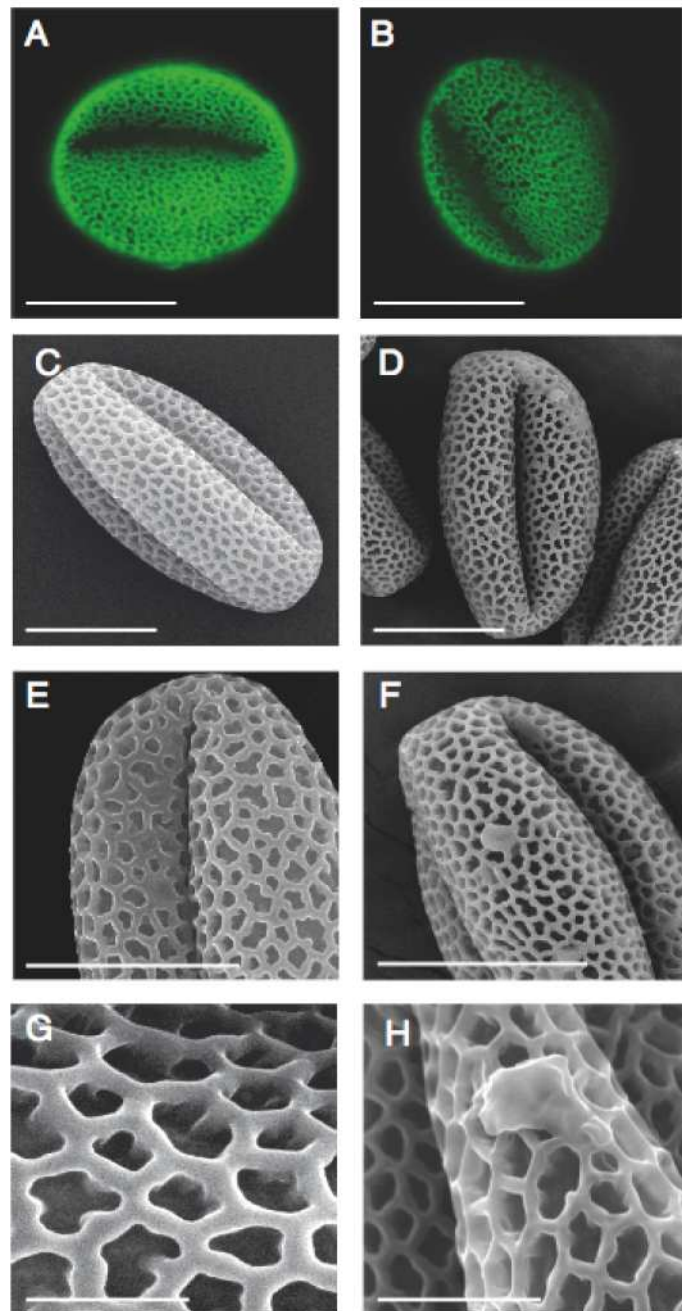
Received October 1, 2010; revised November 24, 2010; accepted December 14, 2010; published December 30, 2010.

REFERENCES

- Aarts, M.G., Hodge, R., Kalantidis, K., Florack, D., Wilson, Z.A., Mulligan, B.J., Stiekema, W.J., Scott, R., and Pereira, A. (1997). The *Arabidopsis* MALE STERILITY 2 protein shares similarity with reductases in elongation/condensation complexes. *Plant J.* **12**: 615–623.
- Ahlers, F., Lambert, J., and Wiermann, R. (2003). Acetylation and silylation of piperidine solubilized sporopollenin from pollen of *Typha angustifolia* L. *Z. Naturforsch., C, J. Biosci.* **58**: 807–811.
- Alonso, J.M., et al. (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**: 653–657.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403–410.
- Alves-Ferreira, M., Wellmer, F., Banhara, A., Kumar, V., Riechmann, J.L., and Meyerowitz, E.M. (2007). Global expression profiling applied to the analysis of *Arabidopsis* stamen development. *Plant Physiol.* **145**: 747–762.
- Arizumi, T., Hatakeyama, K., Hinata, K., Inatsugi, R., Nishida, I., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., and Toriyama, K. (2004). Disruption of the novel plant protein NEF1 affects lipid accumulation in the plastids of the tapetum and exine formation of pollen, resulting in male sterility in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **39**: 170–181.
- Arizumi, T., Hatakeyama, K., Hinata, K., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., and Toriyama, K. (2003). A novel male-sterile mutant of *Arabidopsis thaliana*, *faceless pollen-1*, produces pollen with a smooth surface and an acetolysis-sensitive exine. *Plant Mol. Biol.* **53**: 107–116.
- Baker, M.E., and Blasco, R. (1992). Expansion of the mammalian 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/plant dihydroflavonol reductase superfamily to include a bacterial cholesterol dehydrogenase, a bacterial UDP-galactose-4-epimerase, and open reading frames in vaccinia virus and fish lymphocystis disease virus. *FEBS Lett.* **301**: 89–93.
- Baker, M.E., Luu-The, Y., Simard, J., and Labrie, F. (1990). A common ancestor for mammalian 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and plant dihydroflavonol reductase. *Biochem. J.* **269**: 558–559.
- Blackmore, S., Wortley, A.H., Skvarla, J.J., and Rowley, J.R. (2007). Pollen wall development in flowering plants. *New Phytol.* **174**: 483–498.
- Bubert, H., Lambert, J., Steuernagel, S., Ahlers, F., and Wiermann, R. (2002). Continuous decomposition of sporopollenin from pollen of *Typha angustifolia* L. by acidic methanolysis. *Z. Naturforsch., C, J. Biosci.* **57**: 1035–1041.
- Chen, X., Goodwin, S.M., Boroff, V.L., Liu, X., and Jenks, M.A. (2003). Cloning and characterization of the *WAX2* gene of *Arabidopsis* involved in cuticle membrane and wax production. *Plant Cell* **15**: 1170–1185.
- de Azevedo Souza, C., Kim, S.S., Koch, S., Kienow, L., Schneider, K., McKim, S.M., Haughn, G.W., Kombrink, E., and Douglas, C.J. (2009). A novel fatty Acyl-CoA Synthetase is required for pollen development and sporopollenin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21**: 507–525.
- Doan, T.T., Carlsson, A.S., Hamberg, M., Bülow, L., Stymne, S., and Olsson, P. (2009). Functional expression of five *Arabidopsis* fatty acyl-CoA reductase genes in *Escherichia coli*. *J. Plant Physiol.* **166**: 787–796.
- Dobritsa, A.A., Nishikawa, S.-I., Preuss, D., Urbanczyk-Wochniak, E., Sumner, L.W., Hammond, A., Carlson, A.L., and Swanson, R.J. (2009a). LAP3, a novel plant protein required for pollen development,

- is essential for proper exine formation. *Sex. Plant Reprod.* **22**: 167–177.
- Dobritsa, A.A., Shrestha, J., Morant, M., Pinot, F., Matsuno, M., Swanson, R., Møller, B.L., and Preuss, D.** (2009b). CYP704B1 is a long-chain fatty acid omega-hydroxylase essential for sporopollenin synthesis in pollen of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **151**: 574–589.
- Edgar, R.C.** (2004). MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* **32**: 1792–1797.
- Funa, N., Ozawa, H., Hirata, A., and Horinouchi, S.** (2006). Phenolic lipid synthesis by type III polyketide synthases is essential for cyst formation in *Azotobacter vinelandii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**: 6356–6361.
- Grienenberger, E., Besseau, S., Geoffroy, P., Debayle, D., Heintz, D., Lapierre, C., Pollet, B., Heitz, T., and Legrand, M.** (2009). A BAHD acyltransferase is expressed in the tapetum of *Arabidopsis* anthers and is involved in the synthesis of hydroxycinnamoyl spermidines. *Plant J.* **58**: 246–259.
- Guan, Y.F., Huang, X.Y., Zhu, J., Gao, J.F., Zhang, H.X., and Yang, Z.N.** (2008). RUPTURED POLLEN GRAIN1, a member of the MtN3/saliva gene family, is crucial for exine pattern formation and cell integrity of microspores in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **147**: 852–863.
- Guindon, S., and Gascuel, O.** (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* **52**: 696–704.
- Hamberger, B., Ellis, M., Friedmann, M., de Azevedo Souza, C., Barbazuc, B., and Douglas, C.J.** (2007). Genome-wide analyses of phenylpropanoid-related genes in *Populus trichocarpa*, *Arabidopsis thaliana*, and *Oryza sativa*: the *Populus* lignin toolbox and conservation and diversification of angiosperm gene families. *Can. J. Bot.* **85**: 1182–1201.
- Hertweck, C.** (2009). The biosynthetic logic of polyketide diversity. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **48**: 4688–4716.
- Hruz, T., Laule, O., Szabo, G., Wessendorp, F., Bleuler, S., Oertle, L., Widmayer, P., Gruissem, W., and Zimmermann, P.** (2008). Genevestigator v3: A reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Adv. Bioinformatics* **2008**: 420747.
- Ito, T., Nagata, N., Yoshida, Y., Ohme-Takagi, M., Ma, H., and Shinozaki, K.** (2007). *Arabidopsis* MALE STERILITY1 encodes a PHD-type transcription factor and regulates pollen and tapetum development. *Plant Cell* **19**: 3549–3562.
- Kim, S.S., et al.** (2010). LAP6/POLYKETIDE SYNTHASE A and LAP5/POLYKETIDE SYNTHASE B encode hydroxyalkyl α -pyrone synthases required for pollen development and sporopollenin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **22**: ■■■■.
- Kurata, T., Kawabata-Awai, C., Sakuradani, E., Shimizu, S., Okada, K., and Wada, T.** (2003). The YORE-YORE gene regulates multiple aspects of epidermal cell differentiation in *Arabidopsis*. *Plant J.* **36**: 55–66.
- Lacombe, E., Hawkins, S., Van Doorselaere, J., Piquemal, J., Goffner, D., Poeydomenge, O., Boudet, A.M., and Grima-Pettenati, J.** (1997). Cinnamoyl CoA reductase, the first committed enzyme of the lignin branch biosynthetic pathway: Cloning, expression and phylogenetic relationships. *Plant J.* **11**: 429–441.
- Ma, H.** (2005). Molecular genetic analyses of microsporogenesis and microgametogenesis in flowering plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **56**: 393–434.
- Morant, M., Jørgensen, K., Schaller, H., Pinot, F., Møller, B.L., Werck-Reichhart, D., and Bak, S.** (2007). CYP703 is an ancient cytochrome P450 in land plants catalyzing in-chain hydroxylation of lauric acid to provide building blocks for sporopollenin synthesis in pollen. *Plant Cell* **19**: 1473–1487.
- Owen, H.A., and Makaroff, C.A.** (1995). Ultrastructure of microsporogenesis and microgametogenesis in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. ecotype Wassilewskija (Brassicaceae). *Protoplasma* **185**: 7–21.
- Paxson-Sowers, D.M., Dodrill, C.H., Owen, H.A., and Makaroff, C.A.** (2001). DEX1, a novel plant protein, is required for exine pattern formation during pollen development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **127**: 1739–1749.
- Quilichini, T.D., Friedmann, M.C., Samuels, A.L., and Douglas, C.J.** (2010). ATP-binding cassette transporter G26 is required for male fertility and pollen exine formation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **154**: 678–690.
- Robinson, D.G., Herranz, M.-C., Bubeck, J., Pepperkok, R., and Ritzenthaler, C.** (2007). Membrane dynamics in the early secretory pathway. *Crit. Rev. Plant Sci.* **26**: 199–225.
- Rosso, M.G., Li, Y., Strizhov, N., Reiss, B., Dekker, K., and Weisshaar, B.** (2003). An *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant Mol. Biol.* **53**: 247–259.
- Rowland, O., Lee, R., Franke, R., Schreiber, L., and Kunst, L.** (2007). The CER3 wax biosynthetic gene from *Arabidopsis thaliana* is allelic to WAX2/YRE/FLP1. *FEBS Lett.* **581**: 3538–3544.
- Rozema, J., Broekman, R.A., Blokker, P., Meijkamp, B.B., de Bakker, N., van de Staaij, J., van Beem, A., Ariese, F., and Kars, S.M.** (2001). UV-B absorbance and UV-B absorbing compounds (para-coumaric acid) in pollen and sporopollenin: the perspective to track historic UV-B levels. *J. Photochem. Photobiol. B* **62**: 108–117.
- Rubin-Pitel, S.B., Zhang, H., Vu, T., Brunzelle, J.S., Zhao, H., and Nair, S.K.** (2008). Distinct structural elements dictate the specificity of the type III pentaketide synthase from *Neurospora crassa*. *Chem. Biol.* **15**: 1079–1090.
- Samson, F., Brunaud, V., Balzergue, S., Dubreucq, B., Lepiniec, L., Pelletier, G., Caboche, M., and Lecharmy, A.** (2002). FLAGdb/FST: A database of mapped flanking insertion sites (FSTs) of *Arabidopsis thaliana* T-DNA transformants. *Nucleic Acids Res.* **30**: 94–97.
- Sanders, P.M., Bui, A.Q., Weterings, K., McIntire, K.N., Hsu, Y.-C., Lee, P.Y., Truong, M.T., Beals, T.P., and Goldberg, R.B.** (1999). Anther developmental defects in *Arabidopsis thaliana* male-sterile mutants. *Sex. Plant Reprod.* **11**: 297–322.
- Saxena, P., Yadav, G., Mohanty, D., and Gokhale, R.S.** (2003). A new family of type III polyketide synthases in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* **278**: 44780–44790.
- Scott, R.J., Spielman, M., and Dickinson, H.G.** (2004). Stamen structure and function. *Plant Cell* **16**(Suppl): S46–S60.
- Shirley, B.W., Hanley, S., and Goodman, H.M.** (1992). Effects of ionizing radiation on a plant genome: Analysis of two *Arabidopsis* transparent testa mutations. *Plant Cell* **4**: 333–347.
- Smyth, D.R., Bowman, J.L., and Meyerowitz, E.M.** (1990). Early flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **2**: 755–767.
- Suzuki, T., Masaoka, K., Nishi, M., Nakamura, K., and Ishiguro, S.** (2008). Identification of *kaonashi* mutants showing abnormal pollen exine structure in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **49**: 1465–1477.
- Tang, L.K., Chu, H., Yip, W.K., Yeung, E.C., and Lo, C.** (2009). An anther-specific dihydroflavonol 4-reductase-like gene (*DRL1*) is essential for male fertility in *Arabidopsis*. *New Phytol.* **181**: 576–587.
- Toufighi, K., Brady, S.M., Austin, R., Ly, E., and Provart, N.J.** (2005). The Botany Array Resource: e-Northers, Expression Angling, and promoter analyses. *Plant J.* **43**: 153–163.
- Wilkins, O., Nahal, H., Foong, J., Provart, N.J., and Campbell, M.M.** (2009). Expansion and diversification of the *Populus* R2R3-MYB family of transcription factors. *Plant Physiol.* **149**: 981–993.
- Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G.V., and Provart, N.J.** (2007). An “Electronic Fluorescent Pictograph” browser

- for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS ONE* **2**: e718.
- Xie, D.Y., Sharma, S.B., Paiva, N.L., Ferreira, D., and Dixon, R.A.** (2003). Role of anthocyanidin reductase, encoded by *BANYULS* in plant flavonoid biosynthesis. *Science* **299**: 396–399.
- Yang, C., Vizcay-Barrena, G., Conner, K., and Wilson, Z.A.** (2007). *MALE STERILITY1* is required for tapetal development and pollen wall biosynthesis. *Plant Cell* **19**: 3530–3548.
- Yau, C.P., Zhuang, C.X., Zee, S.Y., and Yip, W.K.** (2005). Expression of a microsporocyte-specific gene encoding DIHYDROFLAVONOL 4-REDUCTASE-LIKE protein is developmentally regulated during early microsporogenesis in rice. *Sex. Plant Reprod.* **18**: 65–74.
- Zhang, D., Liang, W., Yin, C., Zong, J., Gu, F., and Zhang, D.** (2010). *OsC6*, encoding a lipid transfer protein, is required for postmeiotic anther development in rice. *Plant Physiol.* **154**: 149–162.



Supplemental Figure 3. Comparison of exine architecture in wild-type and *tkpr2-2* pollen.

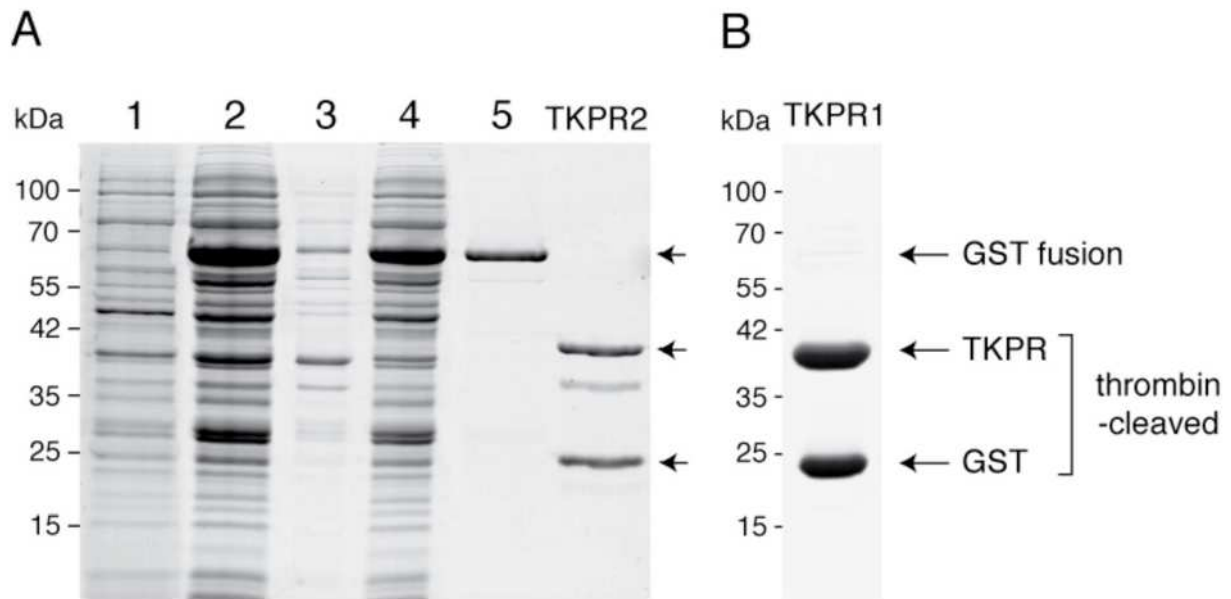
(A), (C), (E) and (G) Wild-type pollen

(B), (D), (F) and (H) : *tkpr2-2* pollen

(A) and (B) Epifluorescence microscope images of wild-type and mutant pollen. Pollen was stained with the fluorescent dye auramine O and visualized using fluorescein isothiocyanate settings.

(C) to (H) Scanning electron micrographs of wild-type and mutant pollen grains.

Scale bars = 10 μm (**A-F**), 2 μm (**G, H**)

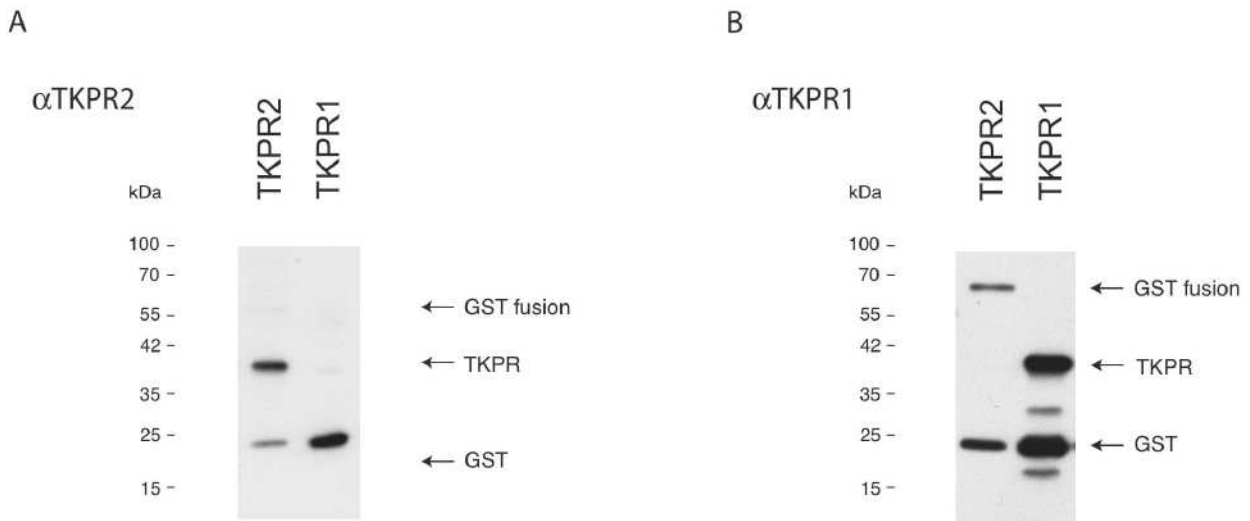


Supplemental Figure 4. Analysis of recombinant protein preparations at different steps of purification.

Bacterial protein extracts were prepared and purified as described in Methods section. Protein preparations were analyzed by electrophoresis on SDS-polyacrylamide gels and Coomassie Blue staining.

(A) Purification steps of TKPR2 are illustrated. Lane 1, total protein from uninduced bacteria ; lane 2, total protein from induced bacteria that was further fractionated; lane 3, soluble fraction ; lane 4, insoluble fraction ; lane 5, fusion protein from soluble fraction purified by affinity chromatography on glutathion-agarose ; TKPR2, thrombin-cleaved preparation containing reductase and GST proteins (arrows).

(B) Purified TKPR1 preparation after affinity chromatography and thrombin cleavage.



Supplemental Figure 5. Characterization of antibodies raised against TKPR proteins. Purified recombinant TKPR1 and TKPR2 proteins were immunoblotted with each polyclonal serum.

(A) Polyclonal antibodies raised against TKPR2 recombinant protein recognized TKPR2 but not TKPR1. The presence of anti GST antibodies was also evidenced.

(B) Antibodies raised against TKPR1 were specific for TKPR1 protein and did not react with TKPR2. Anti GST antibodies were also present in the serum and detected GST protein.

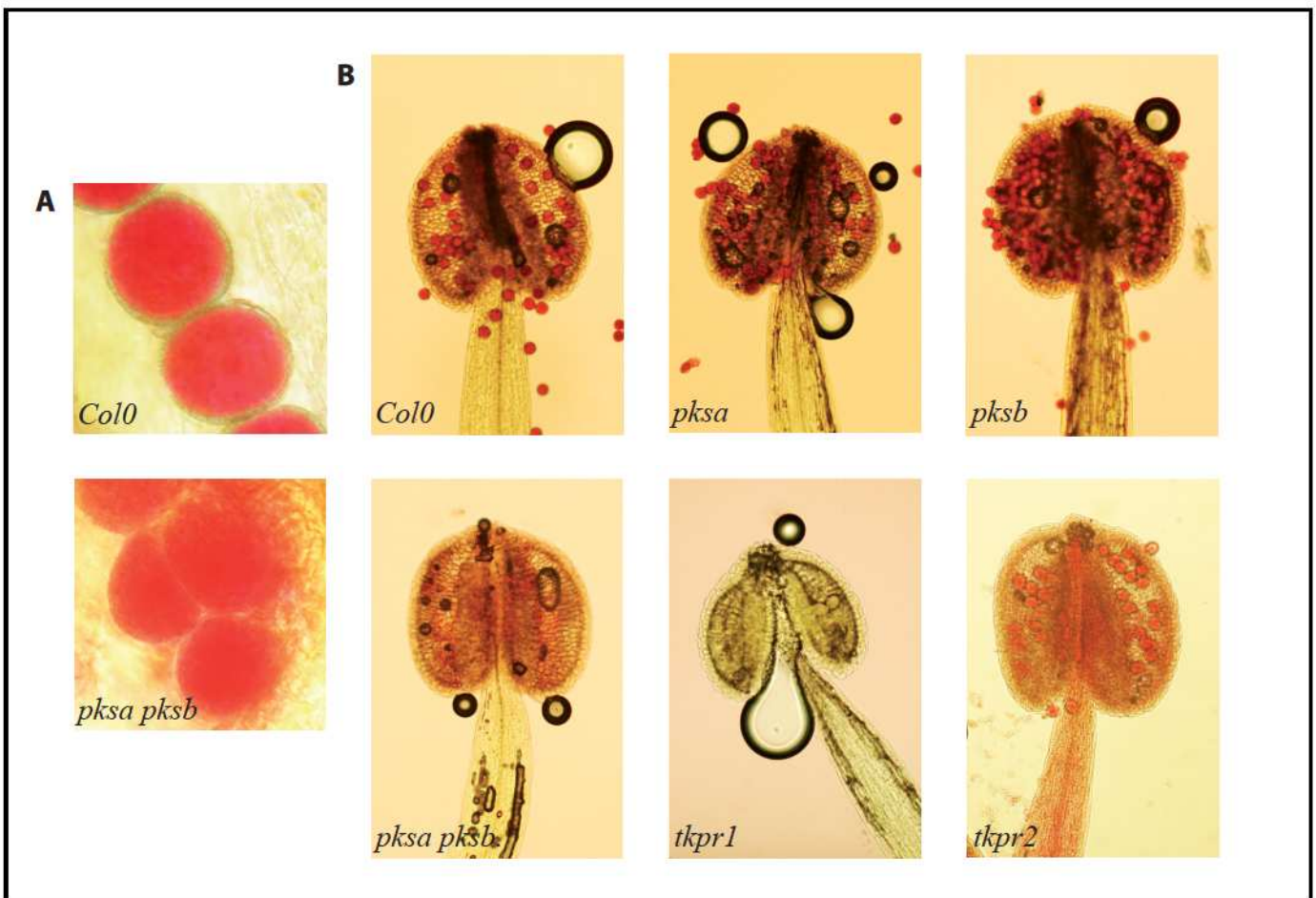


Figure III.2 Test de la viabilité du pollen d'Arabidopsis de différents génotypes.

La viabilité du pollen est révélée par une coloration d'Alexander. Le pollen dont le cytoplasme est rose est viable. L'exine est visualisée en vert. (A) aggrandissement de grains de pollen issus d'une plante sauvage (*Col0*) ou du double mutant *pksa pksb*. (B) Vue de l'anthere de plante sauvage ou issus des mutants *pksa*, *pksb*, *tkpr1*, *tkpr2* ou du double mutant *pksa pksb*. Les observations ont révélé l'absence presque totale de grains de pollen pour les mutants *tkpr1* et *pksa pksb*. Aucun des autres mutants ne présente de réduction évidente de viabilité par rapport au sauvage.

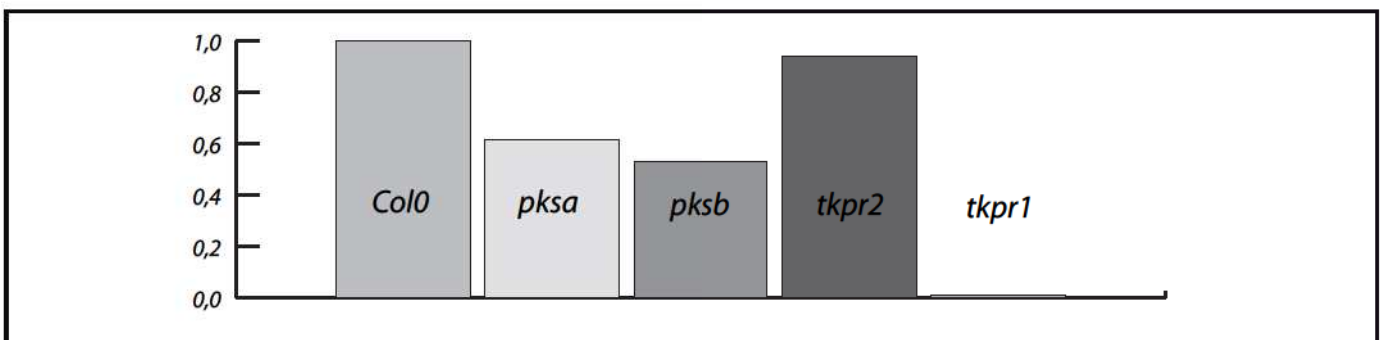


Figure III.3 Tests *in vitro* de germination de grains de pollen.

Les grains de pollen sauvage ou provenant des plantes mutantes *pksa* (*At1g02050*), *pksb* (*At4g34850*), *tkpr1* (*At4g35420*), *tkpr2* (*At1g68540*) sont déposés sur un milieu de germination coulé sur une lame. Celles-ci sont placées dans une boîte fermée avec un papier humide, puis placées à l'obscurité, à une température de 22°C. Après 2 à 16h de germination le pollen est observé au microscope optique. Sont représentés ici les proportions de grains de pollen ayant germé par rapport au pollen sauvage *Col0*.

2.5. Certains grains de pollen mutants *pksa*, *pksb*, *tkpr1* et *tkpr2* sont viables

Au regard des défauts observés au niveau du grain de pollen, nous pouvions supposer qu'ils entraîneraient une perte de viabilité. Pour vérifier cela, j'ai réalisé des colorations d'Alexander sur des étamines provenant des différents génotypes étudiés juste avant qu'elles ne s'ouvrent et libèrent le pollen. De façon surprenante, aucun des mutants ne présente de réduction évidente de viabilité des grains de pollen par rapport au sauvage (figure III.2), du moins avant déhiscence de l'anthere. Les défauts observés au niveau de la paroi n'affectent donc que la synthèse de la paroi comme confirmé par l'observation des quelques grains de pollen survivant dans les étamines du double mutant *pksa pksb* qui ne présentent plus de paroi (cercle vert autour du pollen sauvage figure III.2A et absent chez le double mutant). Cette même expérience a été effectuée pour le mutant *tkpr1* et les observations ont révélé l'absence presque totale de grains de pollen (figure III.2B).

Pour préciser ce résultat, un test de germination *in vitro* a été pratiqué. J'ai déposé sur un milieu de germination, des grains de pollen provenant d'étamines venant de s'ouvrir. En conditions d'humidité et de température contrôlées, les grains de pollen ayant germé et formé des tubes polliniques ont été comptés après 24h et les résultats exprimés par rapport au nombre de grains de pollen total. Une différence de fertilité variable a été observée comparée aux grains de pollen sauvages (figure III.3) indiquant que les défauts de paroi ont une influence sur la viabilité des grains de pollen à l'extérieur de l'étamine et sur leur germination. Les étamines du mutant *tkpr1* ne contenant que trop peu de grains de pollen, le taux de germination n'a pas pu être mesuré.

II. Les enzymes intervenant dans la synthèse de sporopollénine forment un métabolon associé au RE

1. Contexte du projet de recherche

Chez *Arabidopsis thaliana*, à partir de l'instant où le développement d'un bourgeon floral est initié, les siliques sont formées en sept jours, mais la synthèse des précurseurs de sporopollénine puis leur polymérisation autour des centaines de grains de pollen ne prend que quelques heures (figure I.10). Ceci implique que les voies de biosynthèse à l'origine de ces

Les enzymes intervenant dans la synthèse de sporopollénine forment un métabolite associé au RE

composés doivent générer un flux métabolique important, ce qui demande une grande efficacité de la chaîne biosynthétique et un apport conséquent de substrats et d'énergie.

Tout commence dans les plastes des cellules du tapétum qui sont le lieu de synthèse des acides gras. Beaucoup de changements ultrastructuraux associés avec un métabolisme lipidique actif au sein des cellules du tapétum lors du développement de l'anthere ont été rapportés (Hsieh and Huang, 2005; Ishiguro et al., 2010; Owen and Makaroff, 1995; Piffanelli et al., 1998; Wu et al., 1997; Zheng et al., 2003). Par exemple, la dilatation et la prolifération du réticulum endoplasmique ont pu être observées. L'accumulation de nombreuses vésicules ou organelles remplis de matériel lipidique, notamment les élaïoplastes et tapétosomes, a également été constatée dans les cellules du tapétum (Clément et al., 1998; Ishiguro et al., 2010; Murgia et al., 1991; Owen and Makaroff, 1995; Zheng et al., 2003). Ces indices montrent bien qu'une activité métabolique lipidique intense prend place au sein des cellules du tapétum connu pour fournir les précurseurs de l'exine. Les acides gras produits au sein des plastes sont ensuite exportés vers le réticulum endoplasmique où ils subissent hydroxylations, désaturations et élongations indispensables à la synthèse des précurseurs du manteau et de l'exine.

Cet apport massif d'acides gras vers le réticulum implique une grande efficacité des voies de biosynthèse en aval. En outre, l'accumulation d'une grande quantité d'acides gras pourrait déstabiliser le réticulum endoplasmique et donc les cellules (Samuels et al., 2008). La façon dont ces substrats sont transportés vers le réticulum n'est pas connue mais nécessiterait une activation par un couplage au CoA. Une étude récente a démontré l'intervention de l'acyl-CoA synthétase ACOS5 dans ce processus. Puis nos études ont montré que ces esters de CoA d'acides gras pouvaient être utilisés par les polykétides synthétases PKSA et PKSB pour former des tri et tétrakétides. Les tétrakétides possèdent une fonction cétone sur la même chaîne aliphatique et nous avons pu démontrer que deux réductases, TKPR1 et TKPR2, sont capables de catalyser sa réduction en fonction hydroxyle en présence de NADPH. Les trikétides et tétrakétides réduits synthétisés formeraient des précurseurs de synthèse du polymère de sporopollénine. Les hydroxyles introduits par les CYP703A2 et CYP704B1 ainsi que l'hydroxyle introduit par la réduction de la fonction cétone peuvent être potentiellement impliqués dans les liaisons éther et ester du polymère. Partant du principe que les enzymes ACOS5, CYP703A2, CYP704B1, PKSA, PKSB, TKPR1 et TKPR2 font partie de la voie de biosynthèse des monomères de sporopollénine (Grienenberger et al., 2010; Kim et al., 2010) et dans l'optique de mieux comprendre comment cette voie métabolique est capable de

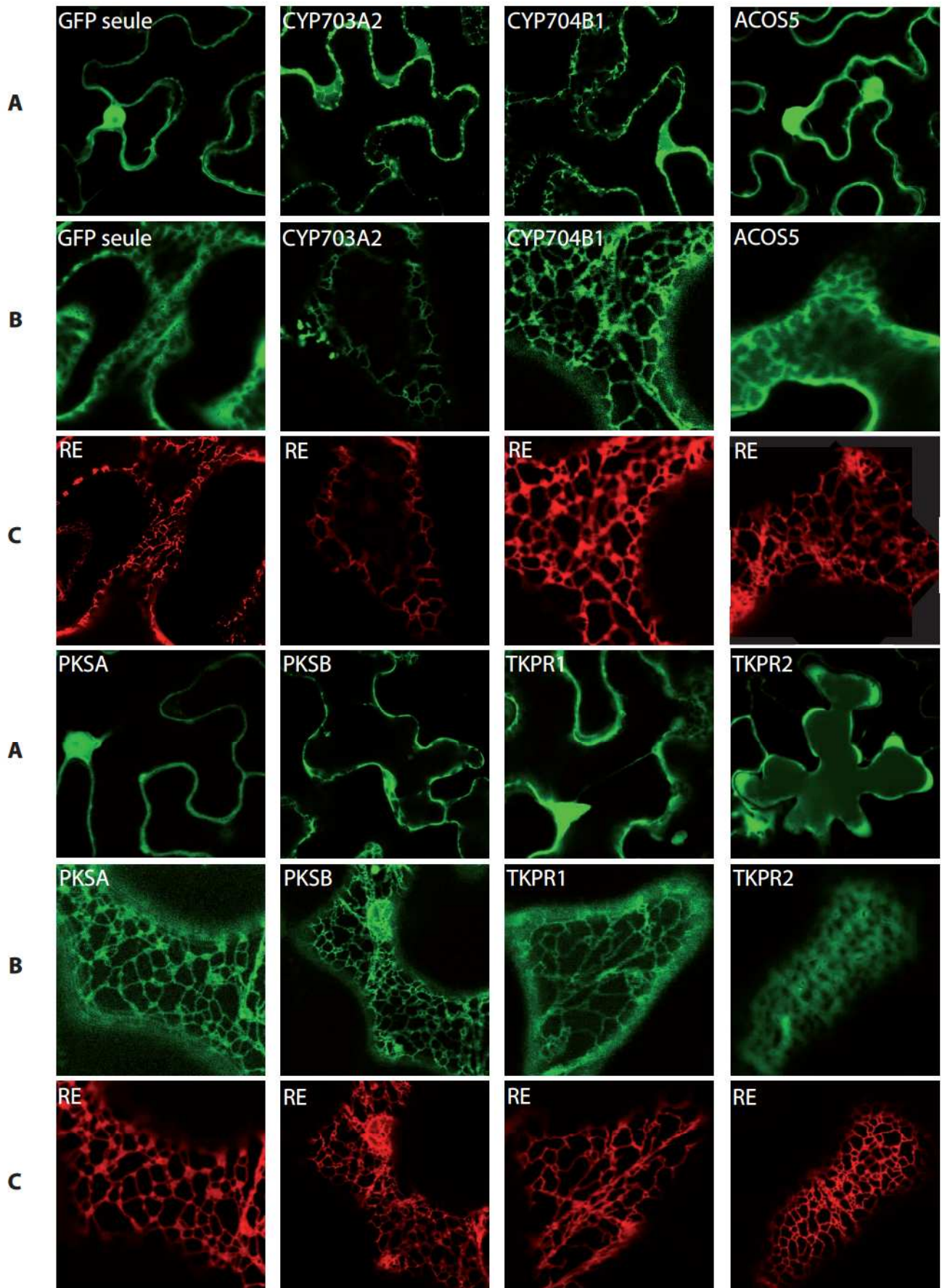


Figure III.4 L'expression des protéines CYP703A2, CYP704B1, ACOS5, PKSA, PKSB, TKPR1 et TKPR2 en fusion à la GFP permet de montrer différentes localisation subcellulaires.

Les protéines ont été co-exprimées transitoirement avec un marqueur du RE (mRFP-HDEL, C) dans les feuilles de *Nicotiana benthamiana* par agrotransformation et observées par microscopie confocale selon un plan focal intracellulaire (A) et cortical (B). Les observations montrent que les protéines CYP703A2, CYP704B1, PKSA, PKSB et TKPR1 sont localisées au niveau du RE. Le marquage d'ACOS5 semble concentré autour du RE alors que celui pour TKPR2 est typiquement cytoplasmique.

produire ces monomères avec un haut rendement, j'ai cherché à étudier son organisation subcellulaire. Pour cela, j'ai commencé par étudier la localisation des différentes protéines.

2. Résultats

2.1. Plusieurs enzymes de la voie de biosynthèse sont localisés au niveau du réticulum endoplasmique

Dans un premier temps, j'ai exprimé de façon transitoire les protéines ACOS5, PKSA, PKSB, TKPR1, TKPR2, CYP703 ou CYP704, couplées au fluorochrome GFP (green fluorescent protein) avec un marqueur du RE couplé à la RFP (red fluorescent protein), dans les feuilles de *Nicotiana benthamiana*. La fluorescence des protéines CYP703A2 et CYP704B1 marque le RE comme attendu puisque ces enzymes ont une ancre membranaire. Le signal des protéines PKSA, PKSB et TKPR1 couplées à la GFP recouvre également celui du marqueur du RE à l'inverse de celui de la protéine TKPR2 qui elle est cytoplasmique (Grienenberger et al., 2010; Kim et al., 2010). Enfin, le marquage de la protéine de fusion ACOS5 est particulier car il est cytoplasmique comme montré précédemment (de Azevedo Souza et al., 2009), mais semble plus concentré autour du RE (figure III.4).

Ce résultat a pu être approfondi par des expériences d'immunolocalisation par microscopie électronique. Des coupes ultrafines de bourgeons d'*Arabidopsis thaliana* et de *Brassica napus* ont été réalisées. Des anticorps spécifiques des différentes protéines ont alors été utilisés pour les localiser au sein du tapétum. Dans ce but, les coupes sont ensuite traitées par un anticorps secondaire couplé à des billes d'or. La figure III.5 présente les résultats d'immunolocalisation obtenus après observation au microscope électronique à transmission. On constate que les coupes traitées avec les sérums pré-immuns ne montrent pas de marquage significatif (figure III.5A). Les sections traitées avec les anticorps anti-PKSA présentent un marquage du RE qui est abondant dans les cellules du tapétum, mieux visualisé à plus fort grossissement (figure III.5B) : le marquage du RE est intense. Une localisation subcellulaire similaire a été constatée lors de l'immunodétection des protéines PKSB (figure III.5C) et TKPR1 (figure III.5E). La protéine ACOS5 se retrouve à la fois sur le RE et dans le cytosol (figure III.5D). Enfin, le marquage obtenu pour la protéine TKPR2 semble indiquer que celle-ci est présente dans toute la cellule du tapétum, sans montrer de localisation spécifique (figure III.5F).

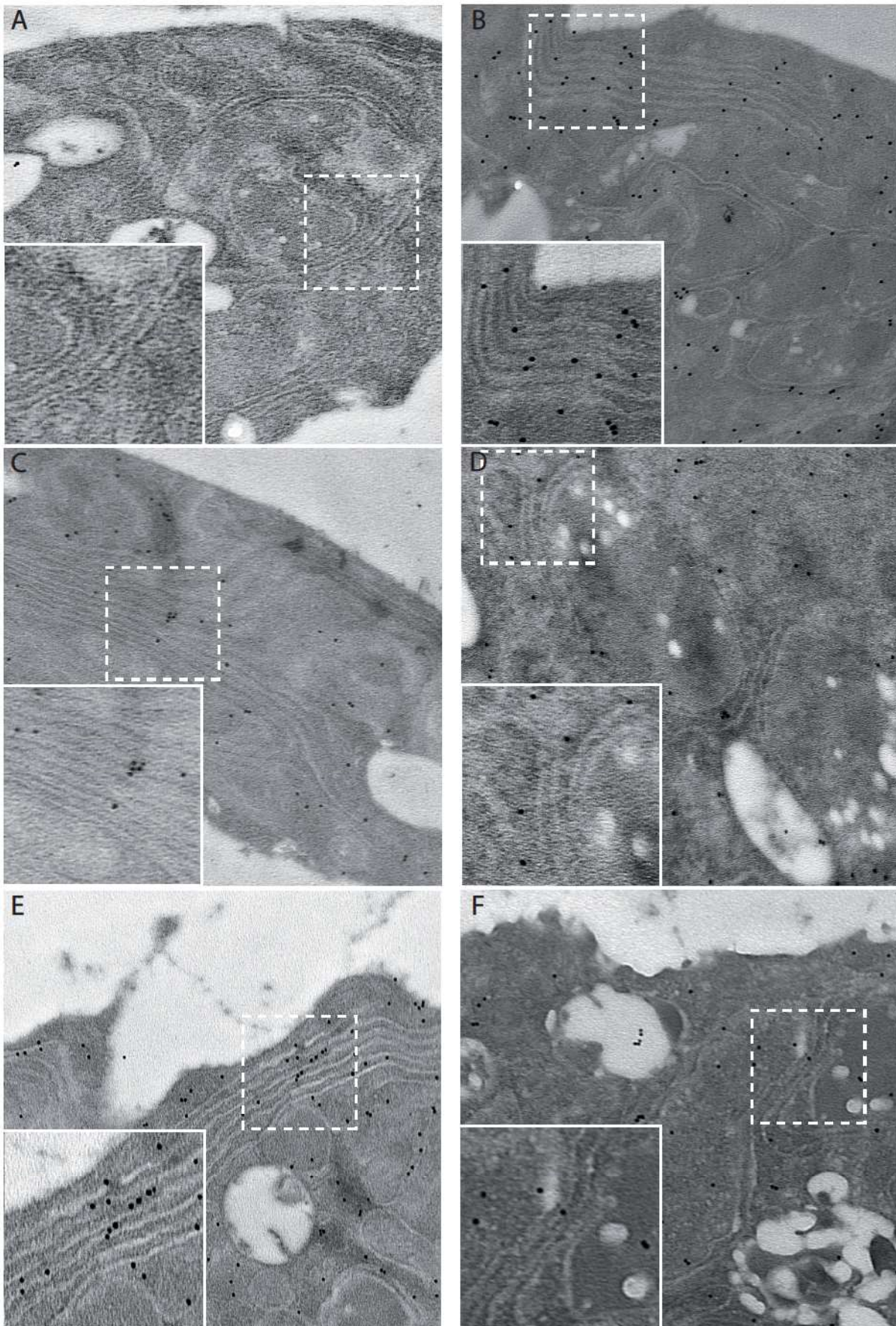


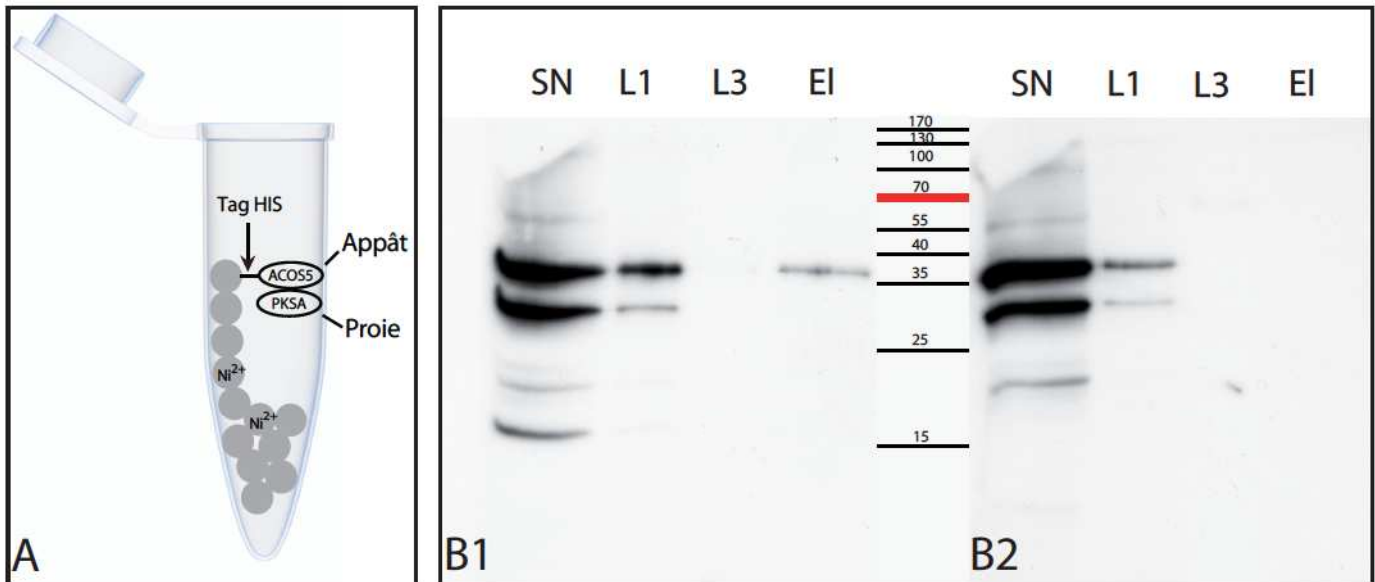
Figure III.5 Immunolocalisation subcellulaire des protéines PKSA, PKSB, ACOS5, TKPR1, TKPR2 dans les cellules du tapétum. Des coupes ultrafines de bourgeons d'*Arabidopsis thaliana* ont été incubées avec des anticorps dirigés contre les protéines PKSA (B), PKSB (C), ACOS5 (D), TKPR1 (E), TKPR2 (F). Seul le stade développement 9-10 correspondant à la formation de la paroi pollinique (selon l'échelle de Smyth et al, 1990) est présenté ci. Un important marquage du RE est constaté pour les protéines PKSA, PKSB et TKPR1. A plus fort grossissement le résultat est plus évident (cadre blanc). La protéine ACOS5 est observée à la fois sur le RE et dans le cytosol. Aucune localisation précise n'est constatée pour TKPR2. Pour chaque expérience de localisation un témoin avec le sérum pre-immun a été réalisé (A) montrant un bruit de fond très faible.

Anticorps	@ACOS5	@PKSA	@PKSB	@TKPR1	@TKPR2
% billes sur RE (n)	52 (880)	82 (4367)	80 (969)	80 (2359)	35 (1854)

Tableau III.1 Immunolocalisation subcellulaire des protéines ACOS5, PKSA, PKSB, TKPR1 et TKPR2

Pour avoir une idée plus précise de la localisation des protéines, les billes d'or ont été comptées visuellement et réparties en deux catégories ; celles placées sur le RE et celles marquant le reste du cytoplasme. Ce comptage a été réalisé sur une vingtaine de coupes pour chaque anticorps. La surface occupée par le RE dans la cellule du tapetum a été évaluée à 30% en moyenne. En comparaison de ce résultat, PKSA, PKSB, TKPR1 et ACOS5 sont bien localisées au niveau du RE. TKPR2 semble uniformément distribuée dans la cellule du tapétum.

n : nombre total de billes d'or comptées



C

Appât		ACOS5			PKSA			PKSB	
		-	+		-	+		-	+
Proie	PKSA			ACOS5			ACOS5		
	TKPR1			TKPR1			TKPR1		
	TKPR2			TKPR2			TKPR2		

Figure III.6 Identification d'interactions protéine-protéine par His pull-down.

A. Représentation schématique de l'expérience réalisée.

B. Exemple typique de résultats obtenus.

B1. La technique d'HIS-Pull-down permet de révéler une interaction entre deux protéines par la rétention spécifique d'une protéine sur une matrice de billes d'agarose en fixant le second partenaire de l'interaction. Pour cela, les protéines d'intérêt recombinantes sont exprimées dans des bactéries et purifiées. 10 µg de protéine recombinante fusionnée à un tag de 3 acides aminés histidine (Tag HIS) ont été fixées sur la matrice de billes d'agarose portant des ions Ni²⁺. Ces protéines ont été utilisées comme appât et leur capacité à fixer différentes protéines proies a été testée. Pour ce faire, 10 µg de protéines proie, sans Tag, potentiellement impliquées dans une interaction sont également chargées. Les protéines non retenues sur la matrice sont éluées au cours de trois lavages (L1 à L3). Une solution d'imidazole 250 mM permet d'éluier la protéine appât et les interactants fixés spécifiquement (E1). L'interaction est révélée par western-blot avec des anticorps spécifiques de la protéine proie.

B2. Les interactions aspécifiques entre la protéine proie et la matrice sont testées en l'absence de protéine appât. L'éluion (B2, piste E1) ne révèle aucun signal.

C. Résumé des interactions testées. Une interaction positive se traduit par la présence d'un signal spécifique sur le blot. Les résultats montrent qu'ACOS5 interagit avec PKSA et TKPR1 alors que les 2 protéines PKS interagissent avec ACOS5 et TKPR1. Aucune interaction n'a été détectée pour TKPR2. Les témoins sans protéines appât sont tous négatifs.

Les enzymes intervenant dans la synthèse de sporopollénine forment un métabolon associé au RE

Pour avoir une idée plus précise de la localisation exacte des protéines et pour obtenir des données statistiques, les billes d'or ont été comptées et réparties en deux catégories ; celles placées sur le RE et celles marquant le reste du cytoplasme. J'ai réalisé ce comptage sur une vingtaine de coupes pour chaque anticorps, ce qui a permis de confirmer une répartition différente pour les protéines étudiées. La compilation des résultats réunie au sein du tableau III.1 montre que environ 80% des protéines PKSA, PKSB, TKPR1 et 50% des signaux ACOS5 sont associés au RE. La localisation de TKPR2 apparaît clairement différente puisque, seulement 35% du marquage TKPR2 est retrouvé sur le RE. Dans le but d'évaluer si ce résultat est significatif, la surface occupée par le RE sur les coupes a été mesurée au moyen du logiciel ImageJ. J'ai ainsi constaté que celui-ci occupe environ 21 à 32% de la surface cellulaire en fonction de la coupe observée. Ces mesures démontrent que les protéines PKSA, PKSB, TKPR1 et une partie d'ACOS5 sont bien associées au RE, à l'inverse de la protéine TKPR2 qui semble répartie uniformément sur les coupes. Ces résultats sont tout à fait en accord avec ceux obtenus en microscopie confocale.

Cette colocalisation subcellulaire des différentes protéines de la voie de biosynthèse sur le RE, à l'exception de TKPR2, pourrait expliquer le fait que la synthèse des monomères de sporopollénine, leur export et polymérisation puisse se dérouler en quelques heures seulement. Nous avons vu que ceci implique une grande efficacité de la voie de biosynthèse qui doit générer un flux métabolique important. L'interaction entre les protéines qui se suivent dans la voie métabolique et donc le transfert du produit formé par une enzyme à l'enzyme suivante au sein d'un métabolon associée à un site cellulaire particulier, pourrait expliquer cette efficacité.

J'ai donc réalisé différentes expériences *in vitro* et *in vivo* dans le but de mettre en évidence ces interactions protéiques putatives et en fonction des outils disponibles.

2.2. Les enzymes de la voie métabolique forment un métabolon

2.2.1. Caractérisation in vitro de l'interaction entre protéines par HIS pull-down

Des protéines recombinantes couplées à une étiquette de 6 Histidines ont été exprimées dans les bactéries et fixées sur une matrice d'agarose par affinité pour les atomes de nickel présents à leur surface. Elles ont été utilisées comme appât et leur capacité à fixer

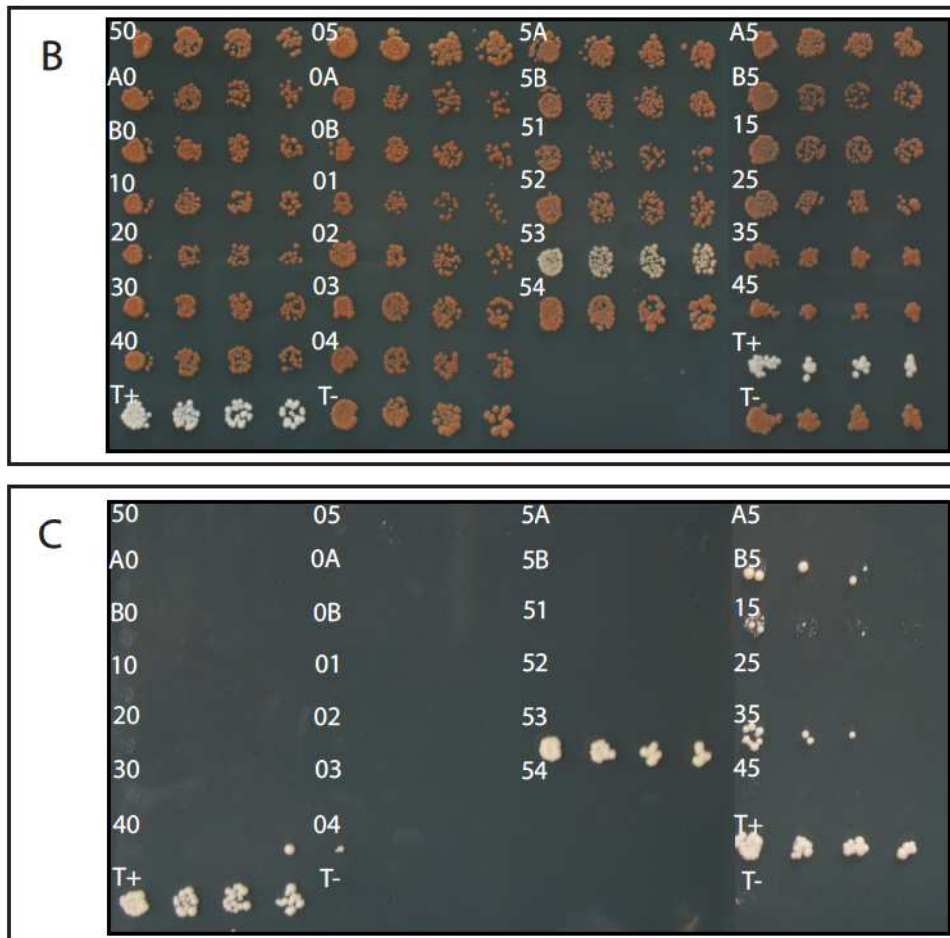
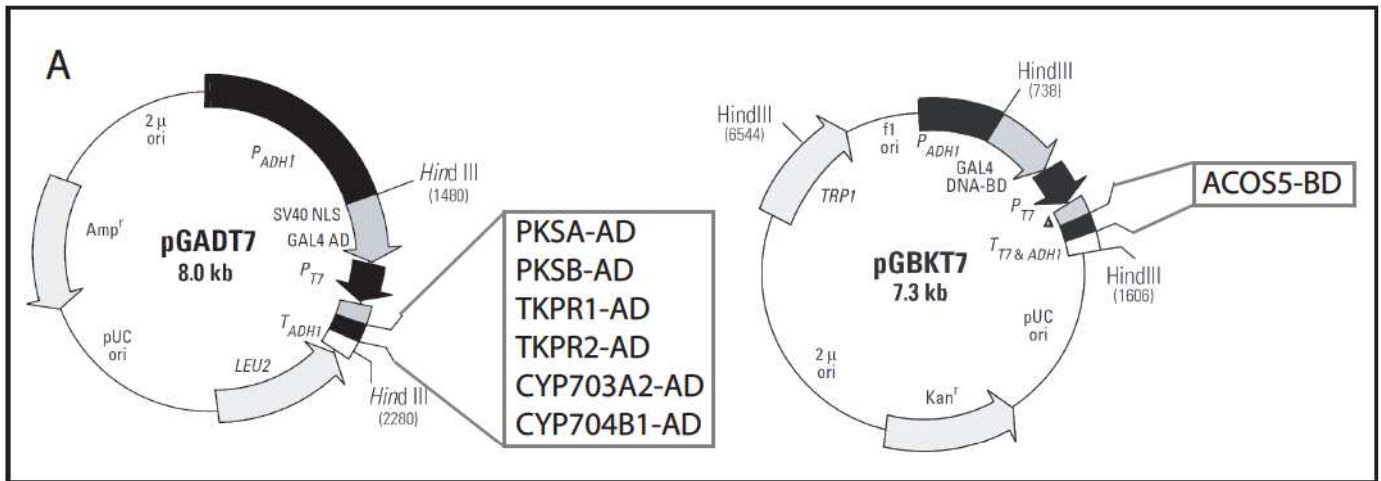


Figure III.7 Interactions détectées par la méthode de double hybride.

Pour tester l'interaction entre deux partenaires protéiques, la souche de levure AH109 a été co-transformée par deux plasmides contenant le domaine AD (pGADT7) ou BD (pGBKT7) du facteur de transcription GAL4 en fusion avec les protéines ACOS5(5), PKSA(A), PKSB(B), TKPRR1(1), TKPR2(2), CYP703(3) ou CYP704(4) ou vide (0). Les levures identifiées par le code 50 sont donc, par exemple, des co-transformants exprimant les protéines AD-ACOS5 et BD. Quatre dilutions ont été déposées.

A. Représentation des constructions réalisées

B. Sélection des co-transformants sur milieu sans Tryptophane ni Leucine.

C. Sélection des levures pour lesquelles l'interaction des protéines de fusion permet de lever l'auxotrophie à l'Histidine sur milieu sans Tryptophane, Leucine ni Histidine. Une interaction entre les protéines ACOS5 et PKSB, TKPR1 ou CYP703A2 est constatée (co-transformants identifiés par les codes B5, 15 et 35). Aucune combinaison impliquant un vecteur vide n'a permis une croissance sur le milieu de sélection signifiant qu'aucune auto-activation des protéines appât ou proie n'est responsable de la croissance des levures.

Les enzymes intervenant dans la synthèse de sporopollénine forment un métabolite associé au RE

des protéines appelées proies a été testée. Après plusieurs lavages pour décrocher les protéines fixées aspécifiquement à la matrice, la présence des protéines proies au sein de complexes protéiques a été testée par western blot en utilisant des anticorps spécifiques de ces dernières sur l'éluat des billes. Les résultats montrent que lorsque la protéine ACOS5 a été utilisée comme appât, les protéines PKSA et TKPR1 ont été retrouvées complexées à la matrice d'affinité par ACOS5 (figure III.6C). Un contrôle en l'absence de protéine appât ACOS5 a été réalisé et montre que les protéines PKSA et TKPR1 n'ont pas été retenues démontrant ainsi que la rétention de ces protéines est spécifique de la formation d'un complexe protéique avec ACOS5 (figure III.6C).

Lorsque les protéines PKSA et PKSB ont à leur tour été utilisées comme appât, elles ont également formé des complexes avec les protéines ACOS5 et TKPR1. Les contrôles effectués en absence de PKSA et PKSB comme appât étaient à nouveau négatifs, excluant ainsi une possible rétention aspécifique des protéines proies sur les billes d'agarose.

Enfin, on remarque qu'avec les différentes protéines appâts utilisées, la formation d'un complexe avec la protéine TKPR2 n'a jamais été observée, révélant ainsi qu'à l'inverse de la protéine TKPR1, TKPR2 ne semble pas se lier avec les protéines ACOS5, PKSA ou PKSB. Ces résultats sont en accord avec la localisation cytosolique de TKPR2 qui contraste avec la localisation sur le RE des autres protéines.

2.2.2. Mise en évidence d'interactions protéiques in vivo par test double hybride dans la levure

J'ai ensuite cherché à confirmer ces résultats par une expérience *in vivo* de double hybride. La méthode est basée sur la reconstitution d'un facteur de transcription fonctionnel (GAL4). La partie activatrice (AD) du facteur de transcription est fusionnée à une protéine appât et la partie de fixation à l'ADN (BD) est fusionnée à une protéine proie (figure III.7A). Après une co-transformation de levure AH109 par différents couples de plasmides, les co-transformants sélectionnés sont étalés sur un milieu minimum ne contenant pas les acides aminés Histidine, Tryptophane et Leucine. S'il y a interaction entre protéine proie et appât, le facteur de transcription GAL4 est à nouveau fonctionnel et permet de lever l'auxotrophie à l'Histidine. L'interaction peut donc être visualisée par la croissance de colonies de levure sur ce milieu de sélection (figure III.7). Cela a été le cas pour les levures co-transformées avec les constructions BD-ACOS5 et AD-PKSB (code 5B figure III.7C), BD-ACOS5 et AD-TKPR1 (code 51 figure III.7C), BD-ACOS5 et AD-CYP703A2 (code 53 figure III.7C), confirmant

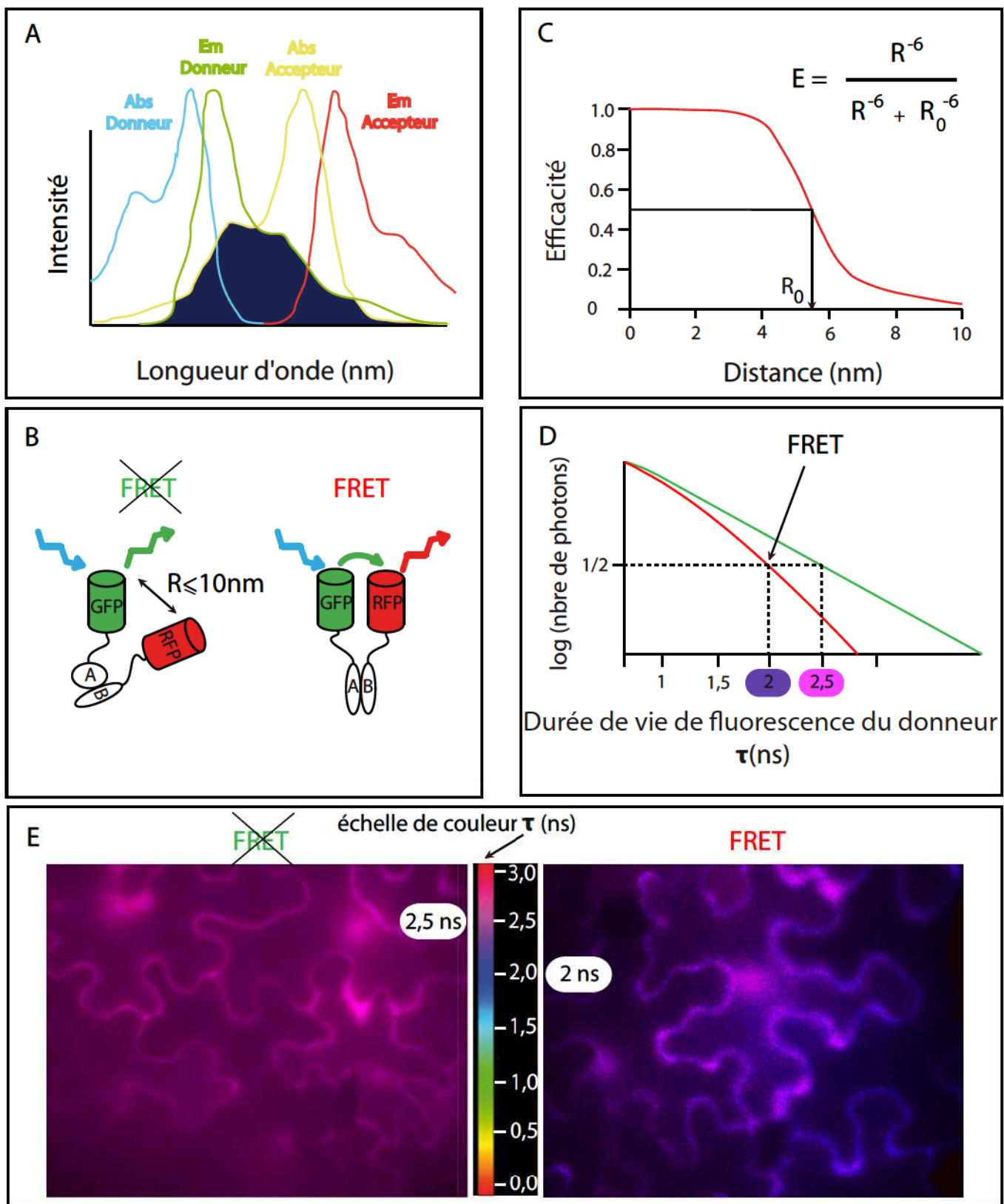


Figure III.8 Théorie du FLIM-FRET en images

Le transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET) est défini comme un transfert d'énergie résultant d'une interaction entre deux molécules (donneur et accepteur d'énergie). Ce phénomène nécessite que le spectre d'émission du donneur recouvre, au moins partiellement, le spectre d'absorption de l'accepteur (A). L'orientation donneur / accepteur doit également être favorable (B) et la distance entre les partenaires inférieure à 10 nm (C) ou 1.8 x le rayon de Förster (R_0 , distance donneur-accepteur pour laquelle l'efficacité du transfert d'énergie est de 50 %). L'interaction entre deux protéines fusionnées à un fluorochrome peut être observée par la fluorescence de l'accepteur (B) ou par une diminution de la durée de vie de fluorescence du donneur (D). Nous utiliserons la valeur de demie-vie qui correspond à la durée moyenne pour laquelle la moitié des fluorophores restent à l'état excité après absorption d'un photon. Cette demie-vie, et donc l'interaction, peuvent être représentées par une échelle de couleur donnée au centre de l'image E.

Les enzymes intervenant dans la synthèse de sporopollénine forment un métabolon associé au RE

ainsi que la protéine ACOS5 interagit avec les protéines PKSB, TKPR1 et CYP703A2 (figure III.7C). La co-transformation de levures avec les constructions AD-appât ou BD-proie avec le plasmide vide contenant le domaine BD ou AD a servi de contrôle. Aucune de ces combinaisons n'a généré de colonies sur le milieu de sélection démontrant qu'aucune auto-activation des protéines appât ou proie seule n'est responsable de la croissance des levures observée. La levée d'auxotrophie est donc bien due à une interaction spécifique. Les combinaisons inverses ont également été testées (BD-PKSB et AD-ACOS5), mais n'ont pas permis de lever l'auxotrophie, soulevant ainsi l'importance de l'orientation des partenaires. Les expériences de double hybride ont donc permis de confirmer les interactions protéine-protéine seulement dans le cas d'un nombre limité de combinaisons.

2.2.3. L'analyse par FLIM-FRET montre que les protéines de la voie métaboliques interagissent à proximité du RE

Le principe de transfert énergétique par résonance (FRET) décrit par Förster en 1946 a été utilisé ici pour étudier les interactions entre protéines de la voie de synthèse des monomères de sporopollénine. Le FRET est un processus par lequel l'énergie absorbée par un fluorophore, le donneur, est transférée à un second fluorophore, l'accepteur (figure III.8 A et B). Comme ce transfert ne peut avoir lieu que si les deux fluorophores sont espacés de moins de 10 nm, ce phénomène peut être appliqué à l'étude de l'interaction entre deux protéines (Sun et al., 2012). Pour ce faire, le fluorochrome eGFP donneur a été fusionné à une des protéines d'intérêt et le fluorochrome RFP récepteur à un des interactants possibles. La eGFP a un spectre d'émission recouvrant partiellement le spectre d'excitation de la RFP (figure III.8A). Si des interactions se forment entre les protéines d'intérêt, leur rapprochement lors de l'excitation de la eGFP permet le transfert de cette énergie à la RFP (figure III.8B). La mesure d'un FRET entre deux fluorophores peut être effectuée en quantifiant les variations de l'intensité de fluorescence. Par exemple par la mesure de la diminution de la fluorescence du donneur ou par l'augmentation de celle de l'accepteur. Chaque fluorophore a un temps de vie de fluorescence fixe qui est défini par ses caractéristiques physiques dont la mesure n'est dépendante ni de l'appareillage, ni du taux d'expression du fluorophore. En théorie, seul un FRET établi avec le fluorophore accepteur peut modifier le temps de vie de fluorescence du fluorophore donneur. L'utilisation de la durée de demi-vie de fluorescence du donneur est ainsi une autre approche à la mesure des événements de FRET. Elle consiste à mesurer le déclin de fluorescence du donneur au cours du temps car la durée de vie de la fluorescence du

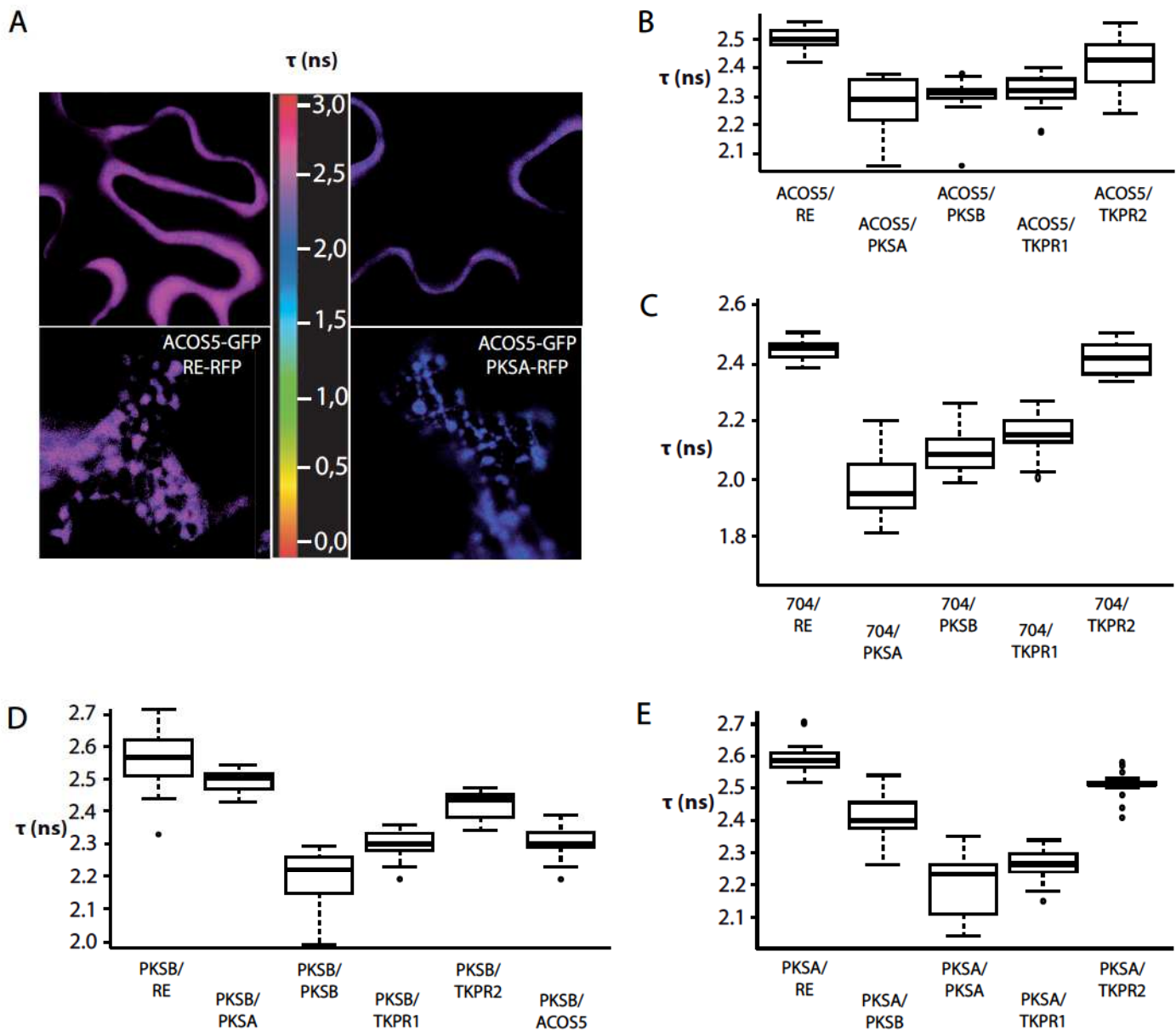


Figure III.9 Recherche d'interaction protéine-protéine *in vivo* par FLIM-FRET.

Le fluorochrome donneur eGFP est fusionné à une protéine appât ACOS5 (B), CYP704B1 (C), PKSB (D) ou PKSA (E) et le fluorochrome RFP accepteur aux protéines proies ACOS5, PKSA, PKSB, TKPR1 et TKPR2 en C-terminal. L'interaction a été recherchée par la méthode de FLIM-FRET et a été visualisée par la variation du temps de demi-vie de fluorescence de la eGFP (B, C, D et E) qui peut être représentée par une échelle de couleur (A). Pour chaque expérience, la durée de demi-vie de la fluorescence de la protéine appât seule et en présence d'un marqueur du RE couplé à la RFP a été mesurée (2,4-2,6ns).

A. Dans le cas de protéines interagissant, les observations ont permis de constater un changement de couleur au niveau du RE montrant que les protéines ainsi que les interactions sont localisées au niveau du RE.

B-C. En présence des protéines PKSA, PKSB et TKPR1 en fusion avec la RFP, le temps de demi-vie de fluorescence de la eGFP des protéines ACOS5-eGFP ou CYP704-eGFP diminue révélant une interaction entre ces protéines.

D. En présence des protéines PKSB, TKPR1 et ACOS5 en fusion avec la RFP, le temps de demi-vie de fluorescence de la eGFP de la protéine PKSB-eGFP diminue, révélant une interaction entre ces protéines.

E. En présence des protéines PKSA, TKPR1 et ACOS5 en fusion avec la RFP, le temps de demi-vie de fluorescence de la eGFP de la protéine PKSA-eGFP diminue, révélant une interaction entre ces protéines.

Aucune interaction n'a pu être constatée avec la protéine TKPR2.

Les enzymes intervenant dans la synthèse de sporopollénine forment un métabolon associé au RE

donneur dépend notamment de l'efficacité du processus de FRET (figure III.8 C, D et E). Par conséquent, plus le transfert d'énergie entre les deux molécules est efficace plus le déclin de fluorescence du donneur est rapide. Cette méthode de mesure a été nommée FLIM pour « fluorescence lifetime imaging microscopy » et des microscopes permettent une mesure du temps de vie de fluorescence pixel par pixel dans une cellule et donc une cartographie des interactions.

Pour mesurer l'interaction entre les protéines de fusion donneuse et receveuse nous avons choisi cette dernière méthode et les résultats sont présentés en figure III.9. Différentes protéines de fusion donneuses ont été utilisées lors de ces tests et des contrôles négatifs en présence d'un marqueur membranaire du RE ont été réalisés et ont permis l'établissement d'une valeur référence d'environ 2,5 ns pour la $\frac{1}{2}$ vie de la fluorescence lorsqu'il n'y a pas d'interaction. Pour chacun des couples testés, les mesures ont été effectuées selon un plan focal transversal intracellulaire et un plan focal cortical (figure III.9 A). Le temps de $\frac{1}{2}$ vie a pu ainsi être mesuré au sein de plusieurs compartiments de la cellule dont le RE. Les différentes valeurs du temps de $\frac{1}{2}$ vie étaient représentées par une gamme de couleur. Lorsque deux protéines interagissaient, les observations ont permis de constater un changement de couleur au niveau du RE montrant que les protéines ainsi que les interactions sont localisées au niveau du RE.

Par exemple, en présence des protéines PKSA, PKSB, TKPR1 en fusion avec la RFP, on constate que le temps de demi-vie de fluorescence des protéines ACOS5-eGFP et 704-eGFP diminue (figure III.9 B et C) ce qui n'est pas le cas lorsque TKPR2-RFP est mise en présence de ces mêmes donneurs. Les efficacités de FRET ont été calculées pour chaque couple. Une efficacité supérieure à 5 % indique une interaction. Les résultats montrent que ACOS5, PKSA, PKSB, TKPR1 et la CYP704B1 interagissent au niveau du RE alors que ce n'est pas le cas pour la protéine TKPR2, ce qui est en lien avec sa localisation subcellulaire différente démontrée en microscopie confocale et électronique.

Dans le but de vérifier que ces variations sont significatives, un test de Student a été réalisé pour chaque couple étudié (tableau III.2). Au cours de ce test, les n mesures de temps de $\frac{1}{2}$ vie de fluorescence faites au cours de 2-3 essais (N) ont été comparées à la moyenne obtenue pour le contrôle négatif. La p -valeur déterminée pour chaque test a été inférieure à 0,05 signifiant que l'hypothèse nulle est rejetée, à l'exception du couple CYP704B1-GFP et TKPR2-eGFP. Il y a bien une différence entre le contrôle négatif et les différentes expériences de test d'interactions réalisés.

Couples
de classe 1

Couples
de classe 2

Donneur	ACOS5-eGFP	ACOS5-eGFP	ACOS5-eGFP	ACOS5-eGFP	ACOS5-eGFP
Receveur	RE-RFP	PKSA-RFP	PKSB-RFP	TKPR1-RFP	TKPR2-RFP
moy τ (ns)	2,5	2,27	2,31	2,31	2,41
N	5	4	4	5	3
n	23	25	26	32	31
p-valeur		3,16E-12	3,18E-07	5,86E-13	2,68E-06
E		9,2	7,6	7,6	3,6

Donneur	704-eGFP	704-eGFP	704-eGFP	704-eGFP	704-eGFP
Receveur	RE-RFP	PKSA-RFP	PKSB-RFP	TKPR1-RFP	TKPR2-RFP
moy τ (ns)	2,44	1,96	2,08	2,15	2,42
N	3	3	3	3	3
n	23	27	29	28	15
p-valeur		<2,2E-16	<2,2E-16	<2,2E-16	2,84E-01
E		19,6	14,75	11,8	0,8

Donneur	PKSB-eGFP	PKSB-eGFP	PKSB-eGFP	PKSB-eGFP	PKSB-eGFP	PKSB-eGFP
Receveur	RE-RFP	PKSA-RFP	PKSB-RFP	TKPR1-RFP	TKPR2-RFP	ACOS5-RFP
moy τ (ns)	2,55	2,49	2,2	2,29	2,42	2,3
N	3	2	2	2	2	2
n	22	20	24	20	20	22
p-valeur		2,80E-03	<2,2E-16	9,88E-14	1,62E-07	1,37E-13
E		2,3	13,7	10,2	5	9,8

Donneur	PKSA-eGFP	PKSA-eGFP	PKSA-eGFP	PKSA-eGFP	PKSA-eGFP
Receveur	RE-RFP	PKSA-RFP	PKSB-RFP	TKPR1-RFP	TKPR2-RFP
moy τ (ns)	2,59	2,2	2,4	2,26	2,51
N	3	3	3	3	3
n	21	21	24	23	22
p-valeur		2,43E-15	4,62E-13	<2,2E-16	1,94E-06
E		15	7,3	12,7	3

Tableau III.2 Comparaison des temps de fluorescence moyens par le test de student.

Dans le but de définir s'il y a interaction entre les protéines donneuses et receveuses, nous avons calculé les moyennes de temps de 1/2 vie de fluorescence de la protéine donneuse pour chaque couple de classe 2 testé (moy τ (ns)). Ces moyennes ont alors été comparées 2 à 2 avec celle d'un couple témoin (classe 1) par le test de Student.

Hypothèse H0 : Il n'y a pas de différence entre les moyennes des couples de classe 2 et 1.

seuil α : probabilité qui conduit à conclure, à tort, à l'absence de différence entre les moyennes

Une p-valeur a été obtenue pour chacune de ces analyses. Si cette p-valeur (ou probabilité critique) est inférieure à la valeur du seuil α préalablement défini (ici 5 %), on rejette l'hypothèse H0. On constate que toutes les moyennes de temps de 1/2 vie de fluorescence, à l'exception de celle obtenue pour le couple CYP704B1-eGFP-TKPR2-RFP, sont significativement différentes de celle obtenue pour le couple de classe 1.

Les efficacités de FRET (E) ont été calculées pour chaque couple. Une efficacité supérieure à 5 % indique une interaction. Les efficacités de FRET calculées lors d'un test d'interaction impliquant le marqueur du RE témoin ou TKPR2 sont inférieurs à 5 % signifiant que les protéines n'intéragissent pas.

τ (ns) : temps de 1/2 vie de fluorescence de la eGFP; moy τ (ns) : Moyenne du temps de 1/2 vie de fluorescence observé pour la protéine donneuse en présence de la RFP couplée au marqueur du RE (couple de classe 1), ou aux protéines de fusion receveuses (couples de classes 2); N, Nombre de duplication de l'expérience; n, Nombre de mesures réalisées; E : efficacité de FRET.

Les enzymes intervenant dans la synthèse de sporopollénine forment un métabolon associé au RE

Le même type d'expérience a été réalisé avec les protéines PKSA-eGFP et PKSB-eGFP comme donneur. A nouveau, une diminution de la durée de vie de fluorescence de ces protéines est constatée en présence des protéines TKPR1 et ACOS5 fusionnées au fluorochrome accepteur mais ce n'est pas le cas pour TKPR2 (figure III.9 D et E). On observe également une diminution de la durée de vie de fluorescence des PKSA-eGFP et PKSB-eGFP lorsqu'elles sont mises en présence des protéines PKSA-RFP et PKSB-RFP respectivement. Les protéines PKSA et PKSB sont des polykétides synthétases de type III et plusieurs études ont montré que ces protéines forment des homodimères (Dobritsa et al., 2010). Ces résultats corroborent donc cette information et confirment que la méthode utilisée est bien adaptée à la détermination d'interactions protéiques *in vivo*. Enfin, on remarque que lorsque les protéines donneuses PKSA-eGFP et PKSB-eGFP ont été utilisées, la diminution du temps de vie de fluorescence du donneur n'était que faiblement affectée par la co-expression de la protéine TKPR2, confirmant ainsi qu'à l'inverse de la protéine TKPR1, TKPR2 ne semble pas former de complexe avec les protéines PKSA ou PKSB.

En conclusion, les expériences de HIS pull-down, le test double hybride chez la levure, et l'expérience de FLIM-FRET ont permis d'obtenir des arguments en faveur de l'existence d'interactions entre les protéines de la voie de biosynthèse de la sporopollénine. Ces résultats sont en faveur de l'existence d'un métabolon qui permettrait un rendement élevé de production de monomères de sporopollénine. L'ensemble de ces résultats sera publié dans un article en préparation et intitulé :

- Sporopollenin biosynthetic enzymes interact and constitute a metabolon localized to the endoplasmic reticulum of tapetum cells.

2.3. Résultats complémentaires

2.3.1. Les interactions au sein du métabolon sont faibles

La synthèse des monomères de sporopollénine nécessite la participation de plusieurs compartiments cellulaires. Les acides gras formés au sein des plastes sont transportés vers le réticulum où ils sont pris en charge par le métabolon que nous avons identifié. Nous avons démontré les interactions entre les enzymes par différentes techniques. Nous avons également montré que ces différentes enzymes sont localisées au niveau du RE, mais comment ce

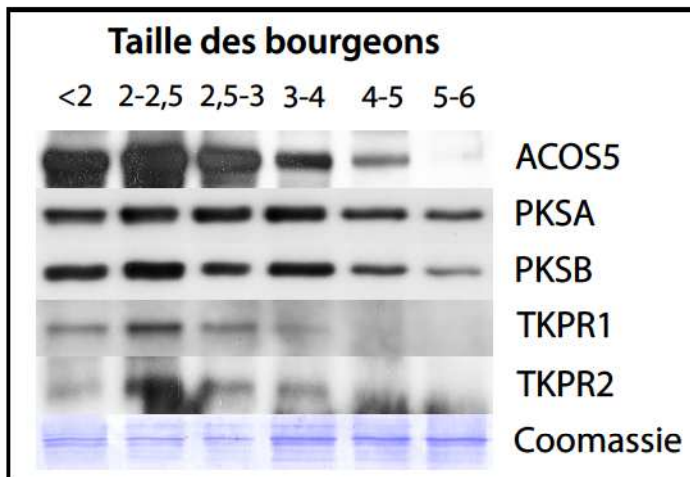


Figure III.10 Immunoblots sur extraits protéiques de bourgeons de *Brassica napus*.

Les extraits protéiques obtenus à partir de bourgeons de différentes tailles (ou stades de développement) ont été séparés par SDS-PAGE puis analysés par western Blot en utilisant des anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre les différentes protéines recombinantes. La coloration au Coomassie sert de témoin de dépôt et permet de pondérer les résultats obtenus par rapport aux protéines totales de l'extrait. On constate que les protéines ACOS5, PKSA, PKSB, TKPR1 et TKPR2 sont exprimées dans les bourgeons de *B. napus* et sont reconnues par les anticorps dirigés contre les protéines d'*Arabidopsis*.

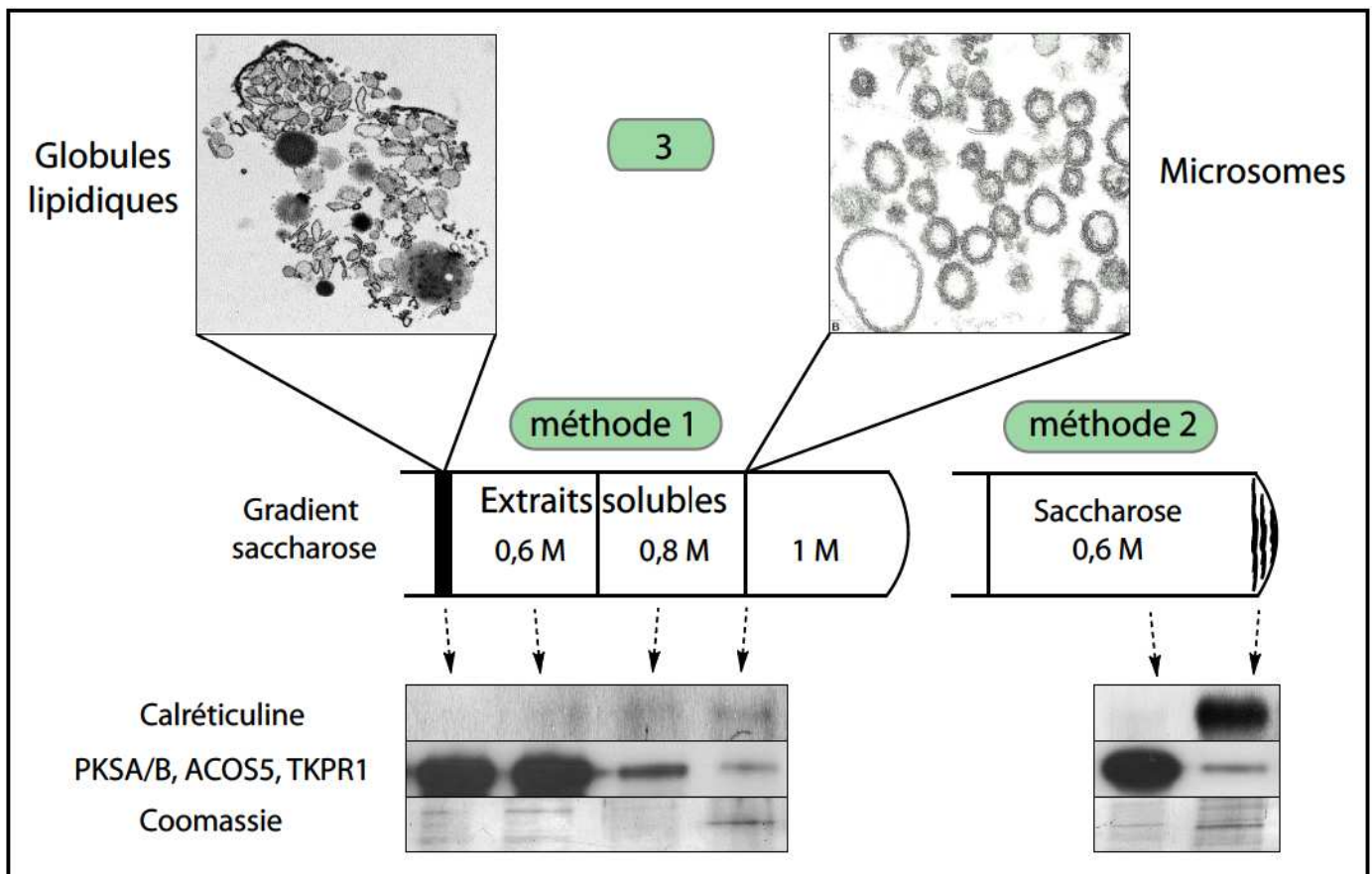


Figure III.11 Immunoblot sur fractionnement subcellulaire d'extraits de bourgeons de *B. napus*.

Un extrait de bourgeons (2-3 mm) est soumis à deux types de fractionnement subcellulaire. La première moitié est déposée sur un gradient formé de trois concentrations différentes de saccharose (0,6; 0,8; 1 M) (1). L'autre moitié est déposée sur une solution de saccharose à 0,6 M (2). Les protéines des différentes fractions ont été séparées par SDS-PAGE et localisées par western blot. La calréticuline est une protéine soluble du RE présente dans la fraction microsomale, elle marque cette fraction. Une analyse par microscopie électronique à transmission permet de vérifier la pureté des fractions (3). On observe que le gradient (2) est plus approprié pour isoler une fraction riche en RE mais que seule une faible fraction des protéines ACOS5, PKSA, PKSB et TKPR1 co-sédimente avec les microsomes. Les interactions entre protéines du métabolisme et RE sont faibles.

Les enzymes intervenant dans la synthèse de sporopollénine forment un métabolon associé au RE

métabolon est-il associé au RE ? Parmi les protéines que nous avons étudiées, seules deux ont une ancre membranaire : les CYP703A2 et CYP704B1. Nous proposons donc que ces protéines constituent les points d'ancrage du métabolon à la surface du RE. Nous avons tenté d'isoler les complexes fixés au RE en réalisant une expérience de fractionnement subcellulaire par ultracentrifugation.

Dans l'impossibilité d'isoler les cellules du tapétum de façon préparative, nous avons séparé les constituants cellulaires d'étamines de *Brassica napus* bien plus faciles à isoler que celles d'*Arabidopsis*. Les séquences des protéines impliquées dans la biosynthèse de la sporopollénine chez *B. napus* sont identiques à plus de 95% à celles d'*Arabidopsis* et une échelle de développement pollinique a été décrite pour cette espèce (Piffanelli et al., 1998). Un western blot a, dans un premier temps, permis de confirmer que les protéines impliquées dans la formation de l'exine chez *B. napus* sont reconnues par les anticorps dirigés contre les protéines d'*Arabidopsis* (figure III.10). Les bourgeons floraux de 2 à 3 mm de long sont ceux où se forme la paroi pollinique autour des grains de pollen, c'est donc le matériel qui a été utilisé pour le fractionnement.

Des étamines isolées à partir de bourgeons de 2-3 mm de long ont alors été cisailées afin de briser les cellules et le réseau de réticulum. Les membranes ont formé spontanément des vésicules appelées microsomes. Une première centrifugation a permis de les séparer des débris végétaux. Le surnageant a alors été séparé en deux parties et les différentes organelles ont été séparées en fonction de leur coefficient de sédimentation selon deux méthodes (figure III.11). Une centrifugation isopycniqne a permis d'isoler les tapétosomes, élaïoplastes et microsomes (figure III.11, méthode 1) et une centrifugation différentielle permet de séparer les protéines solubles d'un culot de microsomes (figure III.11, méthode 2). La présence des enzymes du métabolon a alors été recherchée par western blot dans les différentes fractions. On constate par microscopie à transmission et au moyen du marqueur de calréticuline que les microsomes, élaïoplastes et tapétosomes ont été séparés comme décrit par Hsieh et Huang (Hsieh and Huang, 2007). La méthode 1 permet une faible concentration des microsomes et révèle que les protéines ACOS5, PKSA, PKSB et TKPR1 sont en majorité solubles. La méthode 2 semble elle plus efficace pour concentrer les microsomes puisqu'une forte concentration de calréticuline et donc de RE est retrouvée dans le culot. Par western blot on constate également qu'une faible fraction des protéines ACOS5, PKSA, PKSB et TKPR1 est détectée dans les microsomes, la majeure partie des protéines étant retrouvée parmi les protéines solubles. L'interaction de ces protéines avec le RE semble donc insuffisante pour

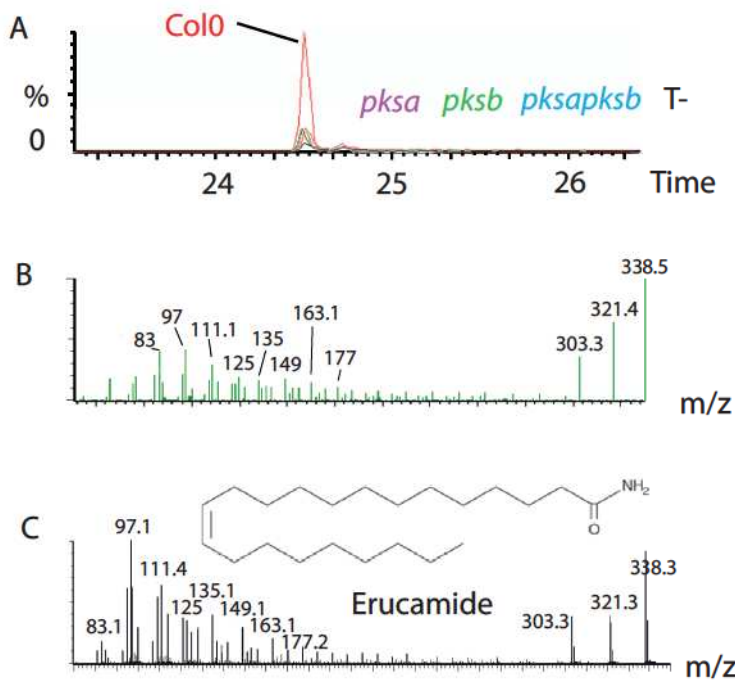


Figure III.12 Caractérisation métabolique de l'activité enzymatique des enzymes PKSA et PKSB

(A) Recherche par LC-MS de différences métaboliques entre les extraits méthanoliques d'étamines obtenus à partir de différents génotypes. L'abondance d'un métabolite de 338,5 Da est très diminuée dans les extraits des génotypes *pksa*, *pkb* et *pkapksb*.

(B) Analyse par LC-MS/MS des produits de fragmentation obtenus à partir de produits de 338,5 Da.

(C) Profil de fragmentation caractéristique de l'erucamide dans des conditions similaires (Kelly K. Nichols et al., 2006). On observe que le profil de fragmentation du métabolite de 338,5Da est similaire à celui de l'erucamide.

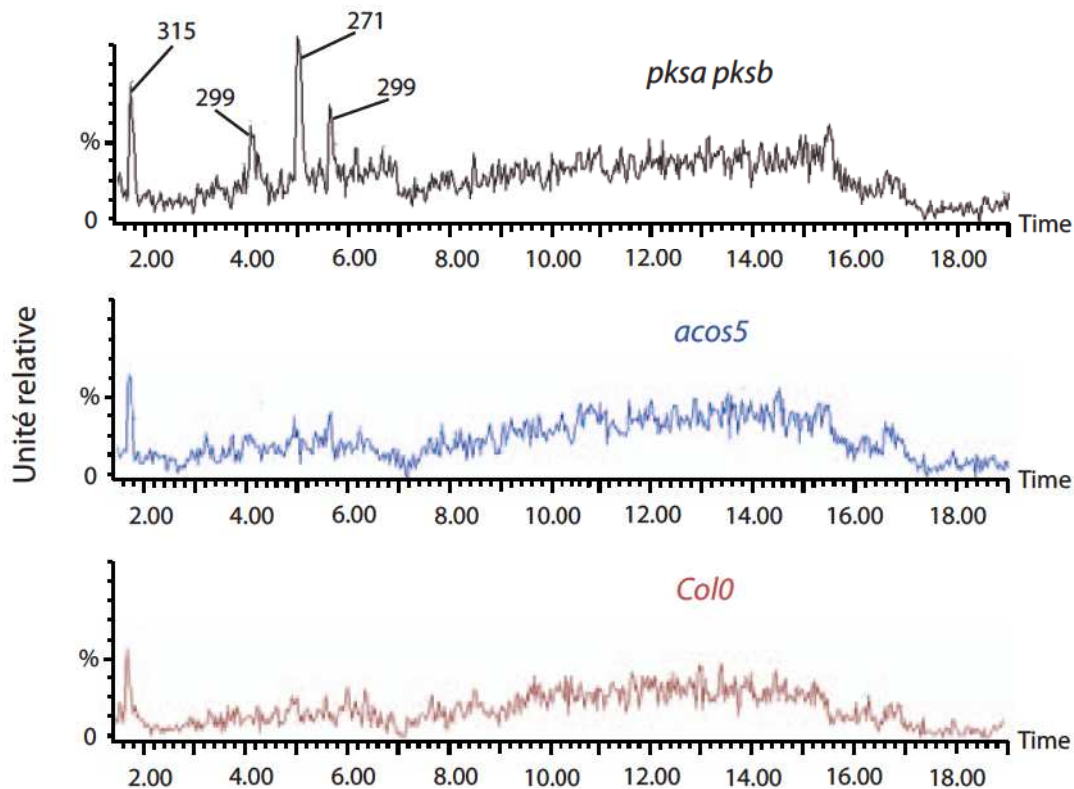


Figure III.13 Identification des substrats des PKSA et PKSB par spectrométrie de masse

La perte de fonction d'une enzyme est censée entraîner l'accumulation de son substrat et la disparition du produit chez la plante mutée. Les PKSA et PKSB ont pour substrats des esters de CoA d'acides gras. Des étamines provenant de plantes sauvages (*Colo*), ou de mutants (*acos5* et *pkapksb*) ont été broyées dans un tampon phosphate contenant 80% de méthanol. Les esters de CoA d'acide gras en solution ont été hydrolysés par basification du milieu. Une analyse par LC-MS a été conduite en mode SIR pour chercher les masses 271, 287, 299 et 315 Da correspondant aux acides gras C16OH, C16diOH, C18OH et C18diOH. On constate l'accumulation de métabolites dont les masses correspondant aux C16OH, C18OH et C18diOH dans l'extrait obtenu à partir d'étamines du double mutant *pkapksb*. Dans les mêmes conditions, l'acide 12-hydroxydecanoïque (standard externe) a un temps de rétention de 3,30 min. Ces résultats suggèrent que les esters de CoA en C16OH, C18OH et C16 dihydroxylés sont les substrats des PKS et s'accumulent chez les mutants.

Les enzymes intervenant dans la synthèse de sporopollénine forment un métabolon associé au RE

obtenir par fractionnement un enrichissement de ces protéines dans une fraction membranaire de RE. La caractérisation des points de fixation du métabolon ou les protéines le composant n'est donc pas possible par cette méthode de fractionnement subcellulaire.

2.3.2. Analyses des profils métaboliques des mutants

La voie métabolique impliquée dans la synthèse de monomères de sporopollénine conduit à des tri- et tétra-kétides α -pyrone *in vitro*. L'identification des produits *in vivo* permettrait de confirmer ce résultat et de lever quelques ambiguïtés notamment sur la position des CYP450 dans la voie de biosynthèse : en d'autres termes, les hydroxylations se situent-elles avant ou après l'action des PKS ? La disparition d'une enzyme chez un mutant est sensée entraîner l'accumulation du substrat de l'enzyme et la disparition des produits en aval dans la chaîne biosynthétique. Des comparaisons de profils métaboliques de mutants et de plantes sauvages ont donc été réalisées. Ont été analysés de jeunes bourgeons où le tapétum est métaboliquement actif et produit les constituants de la paroi du pollen. L'analyse par LC-MS après une simple extraction méthanol/chloroforme (1/2 ; v/v) effectuée sur des bourgeons, a révélé une altération de l'abondance de nombreux composés chez certains mutants (résultats non montrés), mais sans pouvoir les caractériser ou confirmer les structures des produits caractérisés *in vitro*. Ces variations ne sont certainement pas dues directement au blocage de la voie métabolique étudiée, mais pourraient résulter de la non-fixation de composants du manteau sur une exine imparfaite.

Nous avons recherché les produits en analysant les signaux correspondant à leur masse. Pour cela, les différentes enzymes (CYP450, ACOS5 et PKSA/B) pouvant accepter une large gamme de substrats, j'ai dessiné les tri- et tétra-kétides pouvant être formés à partir d'esters d'acides gras possédant de 0 à 3 fonctions hydroxyles/epoxy ou des insaturations. La recherche par SIR des masses correspondantes dans les extraits méthanoliques a permis de détecter plusieurs métabolites dont l'abondance différait entre mutant et sauvage comme l'acide érucique (13-dococénoïque : acide gras en C22 avec une insaturation en position 13; Nichols et al., 2007) dans les mutants *pksa*, *pk sb* et *pk sa pk sb* (figure III.12), mais aucun polykétide n'a pu être identifié. Ceci pourrait indiquer que les précurseurs de la sporopollénine se s'accumulent pas sous cette forme ou que les produits *in planta* sont plus complexes que ceux imaginés.

acide 12-hydroxyhexadécanoïque
= standard externe

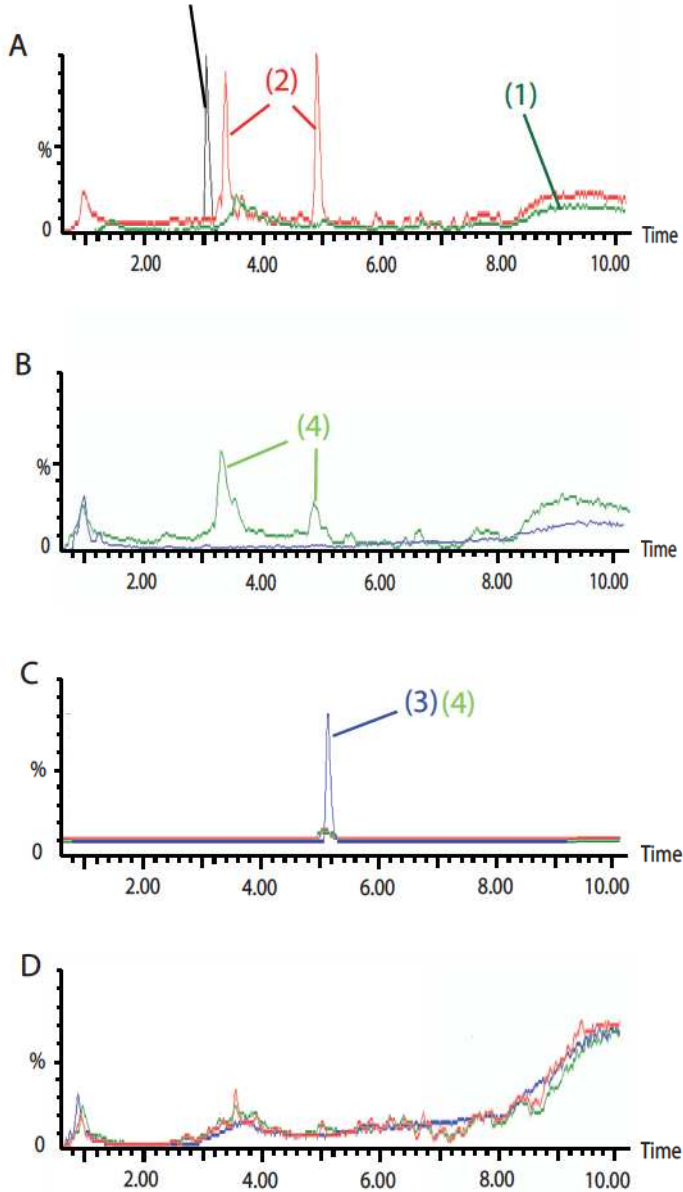


Figure III.14 Caractérisation de la séquence d'intervention des enzymes par analyse métabolique.

La séquence d'activité enzymatique a été étudiée en cherchant à savoir si CYP703A2 pouvait hydroxyler les polykétides.

Pour tester l'activité d'hydroxylation des acides gras, l'enzyme CYP703A2 a été incubée seule (1) ou en présence de C16-CoA (2).

L'action de CYP703A2 sur les polykétides a été testée en incubant l'enzyme CYP703A2 en présence des polykétides (4) formés préalablement par PKS B en présence de C16-CoA et de malonyl-CoA (3).

(A, B) Recherche du produit C16OH par LC-MS. L'analyse a identifié deux métabolites dont la masse est celle du C16OH et dont le temps de migration est proche de l'acide 12-hydroxyhexadécanoïque (standard externe). Ces données suggèrent qu'ils sont issus de l'hydroxylation du C16 ou C16-CoA en deux positions par la CYP703A2.

(C) Recherche des tri- et tétra-kétides par LC-MS. Les tri- et tétra-kétides formés à partir de C16-CoA par PKS B ont été détectés (seul le tétra-kétide est représenté) (3) et (4).

(D) Recherche des tri et tétra-kétides hydroxylés par LC-MS.

Aucun polykétide hydroxylé n'a été détecté signifiant que la CYP703A2 n'hydroxyle pas les polykétides dans ces conditions.

Les enzymes intervenant dans la synthèse de sporopollénine forment un métabolite associé au RE

J'ai également tenté d'identifier les substrats *in planta* des PKS. Ces enzymes condensent des esters de CoA d'acides gras et 2-3 unités de malonyl-CoA. Les esters de CoA sont solubles dans une solution aqueuse. C'est pourquoi, nous avons cherché à extraire les esters de CoA substrats des PKS dans un tampon aqueux. Après s'être débarrassé des débris membranaires et cellulaires par une centrifugation, l'extrait a été analysé par LC-MS à la recherche des masses de différents esters de CoA d'acides gras pouvant être formés par hydroxylation, désaturation ou méthylation successives. Aucune accumulation d'ester de CoA dans les extraits des mutants n'a été observée par cette méthode. Les esters de CoA étant des métabolites fragiles, nous pensions qu'ils pouvaient avoir été hydrolysés en acides gras libres. Nous avons donc entrepris la recherche de l'accumulation des substrats des PKS sous la forme d'acides gras. Pour cela, nous avons optimisé l'analyse des acides gras par LC-MS jusqu'à constater que nous étions capables de visualiser l'acide 12-hydroxyhexadécanoïque à une concentration de 0,1 μM . Pour être sûr que tous les esters de CoA d'acides gras étaient sous forme d'acides gras libres, j'ai augmenté le pH de l'extrait afin de les hydrolyser. De nombreux acides gras de C14 à 20 hydroxylés, insaturés ou méthyles ont alors été recherchés par leur masse nominale. L'accumulation de produits dont la masse coïncide avec celles des acides gras C16OH, C18OH et C16diOH a été observée (figure III.13). Ces résultats suggèrent que les esters de CoA en C16OH, C18OH et C16 dihydroxylés sont les substrats des PKS et s'accumulent chez les mutants. Les hydroxylases à P450 agiraient donc en amont des PKS, soit sur les acides gras libres, soit sur leurs esters de CoA.

Mais les CYP450 pourraient-elles intervenir après l'action des enzymes ACOS5 et PKSA/PKSB et hydroxyler des polykétides ? Pour répondre à cette question, les enzymes CYP703A2 ou PKSB ont été incubés en présence de C16-CoA et de malonyl-CoA (figure III.14). L'analyse par LC-MS des produits de réaction a permis d'identifier deux métabolites dont la masse correspond à celle du C16OH (figure III.14A trace 2) et dont le temps de migration est proche de l'acide 12-hydroxyhexadécanoïque (standard externe). La CYP450 a donc hydroxylé l'acide gras C16 en deux positions. Les tri- et tétra-kétides formés à partir de C16-CoA par PKSB ont également été détectés (figure III.14C trace 3 et 4). L'action de la CYP703A2 sur les polykétides a été testée en ajoutant l'enzyme après formation des polykétides par PKSB. L'analyse en LC-MS par SIR a montré que l'hydroxylase formait bien l'acide gras C16OH à partir de l'ester de CoA encore présent après l'action de PKSB (figure III.14B trace 4), mais aucun polykétide hydroxylé n'a pu être détecté (figure III.14D). Il

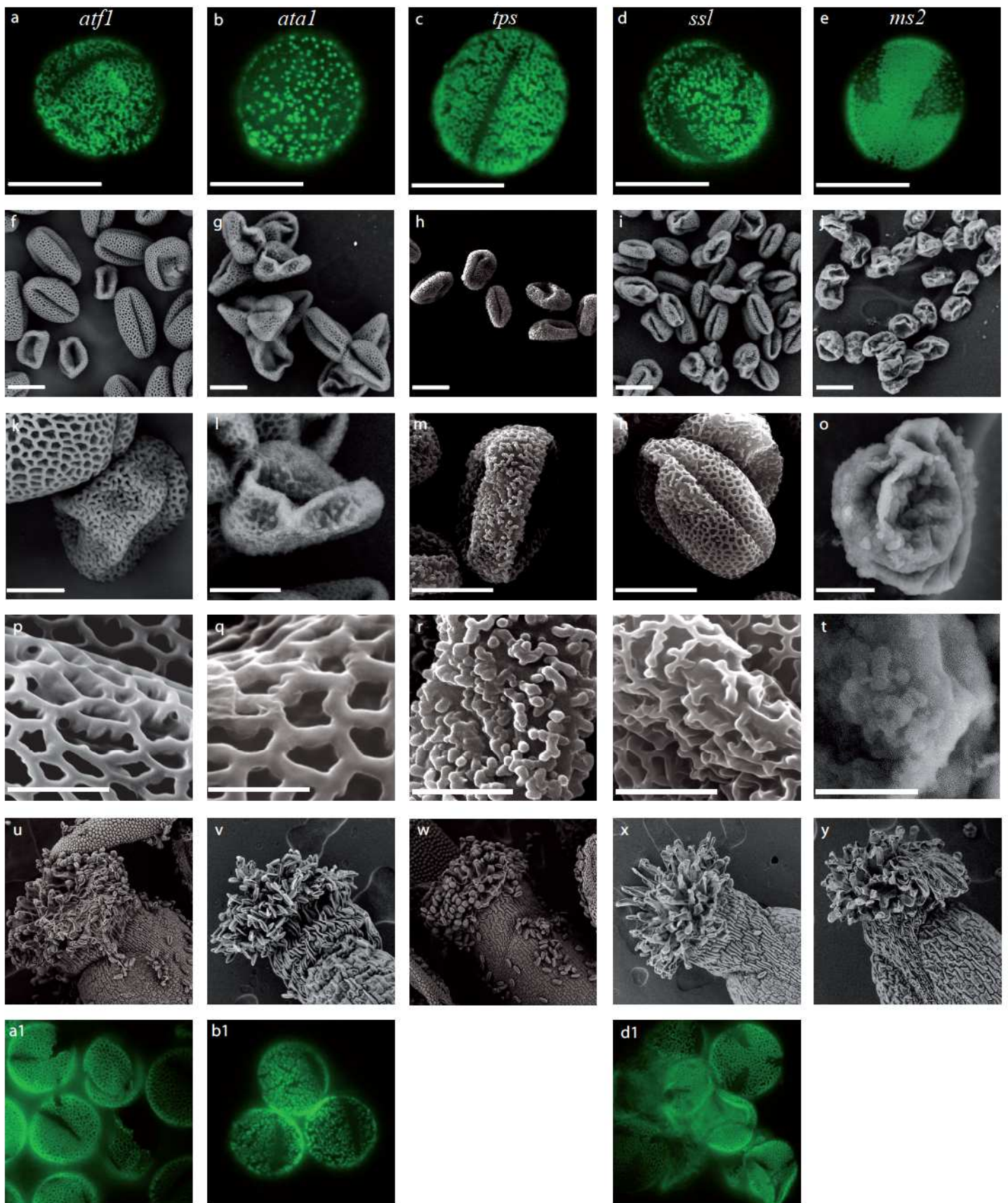


Figure III.15 Analyse phénotypique des pollens issus de plantes mutantes

En comparaison du pollen sauvage, le pollen du mutant *atf1* (*acyltransferase1*) est contracté (a, f, k, p, u, a1); la moitié de celui du mutant *ata1* (*Arabidopsis tapetum1*) est recouvert d'une exine incomplète (b, g, l, q, v, b1); celui du mutant *tps* (*tapetum specific*) présente une absence totale de tectum (c, h, m, r, w). Le pollen du mutant *ssl* (*strictosidine synthase like*) est mal formé et présente des lacunes (d, i, n, s, x, d1); celui du pollen du mutant *ms2* (*male sterility 2*) présente une absence quasi totale de paroi (e, j, o, t, y). En solution aqueuse, les grains de pollen *aft1*, *ata1* et *ssl* restent collés entr eux (a1, b1, d1). Les autres organes floraux (pistil ici) ne présentent aucun phénotype (u, v, w, x, y). a-e : pollen coloré à l'Auramine-O et observé au microscope à épifluorescence. f-y: pollen observé en microscopie électronique à balayage à différents grossissements. Barres pour a-o = 10 μ M, barres pour p-t = 2 μ M

semble que les CYP703A2 hydroxylent les acides gras et/ou les esters de CoA et non les polykétides. Elles seraient donc placées en amont des PKSA et B dans la voie de biosynthèse.

III. Contribution à l'identification d'autres acteurs intervenant dans la synthèse de la paroi pollinique

Les recherches dans les banques de données du transcriptome d'*Arabidopsis* ont révélé d'autres candidats potentiellement impliqués dans la synthèse de la paroi pollinique. Les résultats ont indiqué que les gènes *At1g03390*, *At3g42960*, *At4g20420*, *At3g59530* et *At3g11980* sont également fortement co-régulés avec ACOS5 (figure III.1).

1. Caractérisation de nouvelles lignées mutantes présentant des défauts de synthèse de l'exine

Des mutants d'insertion T-DNA pour chacun de ces gènes ont été obtenus auprès des banques et répertoriés sous *atf1* (*acyltransférase1*) pour le gène *At1g03390*, *ata1* (*Arabidopsis tapetum1*) pour *At3g42960*, *tps* (*tapetum specific*) pour *At4g20420*, *ssl* (*strictosidine synthase like*) pour *At3g59530* et *ms2* (*male sterility 2*) pour le gène *At3g11980*. Des populations issues de ces lignées ont été génotypées et la perte d'expression des différents gènes a été vérifiée par RT-PCR à l'aide d'amorces spécifiques chez des individus homozygotes pour la mutation. L'analyse des grains de pollen issus de ces différents mutants a été réalisée selon le même procédé que précédemment (Grienenberger et al., 2010). Afin d'analyser le dépôt et le patron de l'exine, les grains de pollen ont été observés au microscope électronique à balayage ou colorés à l'Auramine O et observés au microscope à épifluorescence (figure III.15). En comparaison du sauvage, une proportion significative de grains de pollen issus du mutant *atf1* présente une morphologie contractée : le maillage régulier semble conservé mais le grain de pollen semble s'être déshydraté et contracté sur lui-même (figure III.15 1^{ère} colonne). Pour le mutant *ata1*, j'ai constaté que la moitié environ des grains de pollen ne présente aucun phénotype alors que l'autre moitié est mal formée et semble être recouverte d'une exine incomplète et en moindre quantité, sans que le patron ne soit modifié (figure III.15 2^{ème} colonne). Le pollen *tps* présente une absence totale de tectum et donc un maillage anormal mais sans influence sur la fertilité de la plante (figure III.15 3^{ème} colonne). Le pollen des plantes *ssl* présente lui des lacunes et de nombreux grains

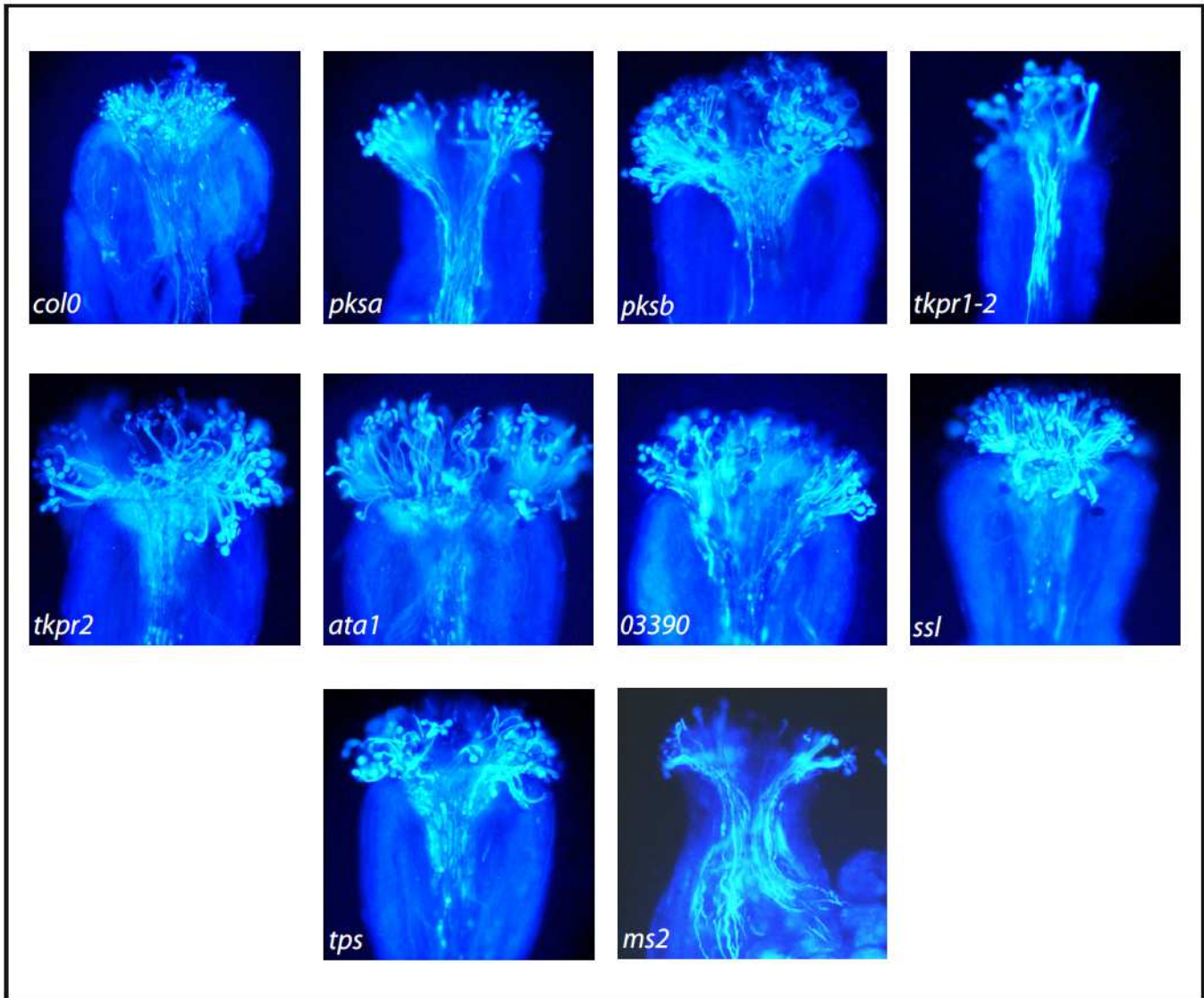


Figure III.16 Tests *in planta* de germination de grains de pollen.

Les stigmates d'une plante sauvage d'*Arabidopsis* sont pollinisés manuellement avec du pollen sauvage ou provenant des plantes mutantes *pksa*, *pksb*, *tkpr1-2*, *tkpr2*, *ata1*, *atf1*, *ssl*, *tps* et *ms2*. Après 24h, le pistil est fixé puis coloré à l'aniline qui révèle la callose du tube pollinique sous lumière UV. Les tests n'ont pas révélé de différence significative dans le potentiel de germination des pollens mutants.

Contribution à l'identification d'autres acteurs intervenant dans la synthèse de la paroi pollinique

de pollen sont mal formés (figure III.15 4^{ème} colonne). Enfin, il m'a également été possible d'observer une absence quasi totale de paroi pour les grains de pollen du mutant *ms2* qui ont en conséquence un aspect aplati et sont non fonctionnels (figure III.15 5^{ème} colonne). D'autres organes floraux ont été observés chez les mutants, mais n'ont présenté aucun phénotype particulier, laissant à penser que l'effet de la mutation de ces gènes n'est pas pléiotropique. Un phénotype particulier a pu être constaté pour le pollen des mutants *atf1*, *ata1* et *ssl* : en solution aqueuse, ces grains de pollen se collent les uns aux autres (figure III.15 a1, b1 et d1). Ce phénotype a déjà été observé et décrit auparavant comme étant une conséquence d'un défaut de l'exine (Dobritsa et al., 2011).

2. Etude fonctionnelle des gènes *At1g03390*, *At3g11980*, *At3g42960*, *At3g59530* et *At4g20420*

J'ai testé la viabilité des grains de pollen de ces nouveaux mutants. J'ai réalisé un test de germination *in vivo* en déposant le pollen d'une étamine de plante mutante sur un pistil provenant d'une plante sauvage. Après incubation en condition de température et d'humidité contrôlées, une coloration à l'aniline permet d'observer les tubes polliniques des grains de pollen ayant germé avec un microscope à épifluorescence. Les grains de pollen mutants, pourtant marqués par une exine imparfaite, conservent un fort potentiel de germination (figure III.16). Les étamines des mutants *tkpr1-2* (lignée mutante hypomorphique) et *ms2* ne contiennent que très peu de grains de pollen. Il a été nécessaire d'utiliser plusieurs étamines pour fertiliser un pistil et obtenir le résultat observé. Ces résultats sont qualitatifs et démontrent que les grains de pollen sont viables. Les gènes étudiés ne jouent donc pas de rôle dans le développement des cellules spermatiques ou génératives du pollen et semblent intervenir spécifiquement dans la synthèse de l'exine.

3. Localisation subcellulaire des gènes candidats

L'ensemble des phénotypes observés semble montrer que les différents gènes étudiés interviennent dans la synthèse de la paroi pollinique. Comme la voie métabolique que nous avons identifiée se trouve associée au RE, j'ai cherché à savoir si ces différentes protéines partageaient cette caractéristique. Dans ce but, j'ai fusionné les régions codantes au fluorochrome GFP et fait exprimer ces constructions par l'hôte *Nicotiana benthamiana*. Une

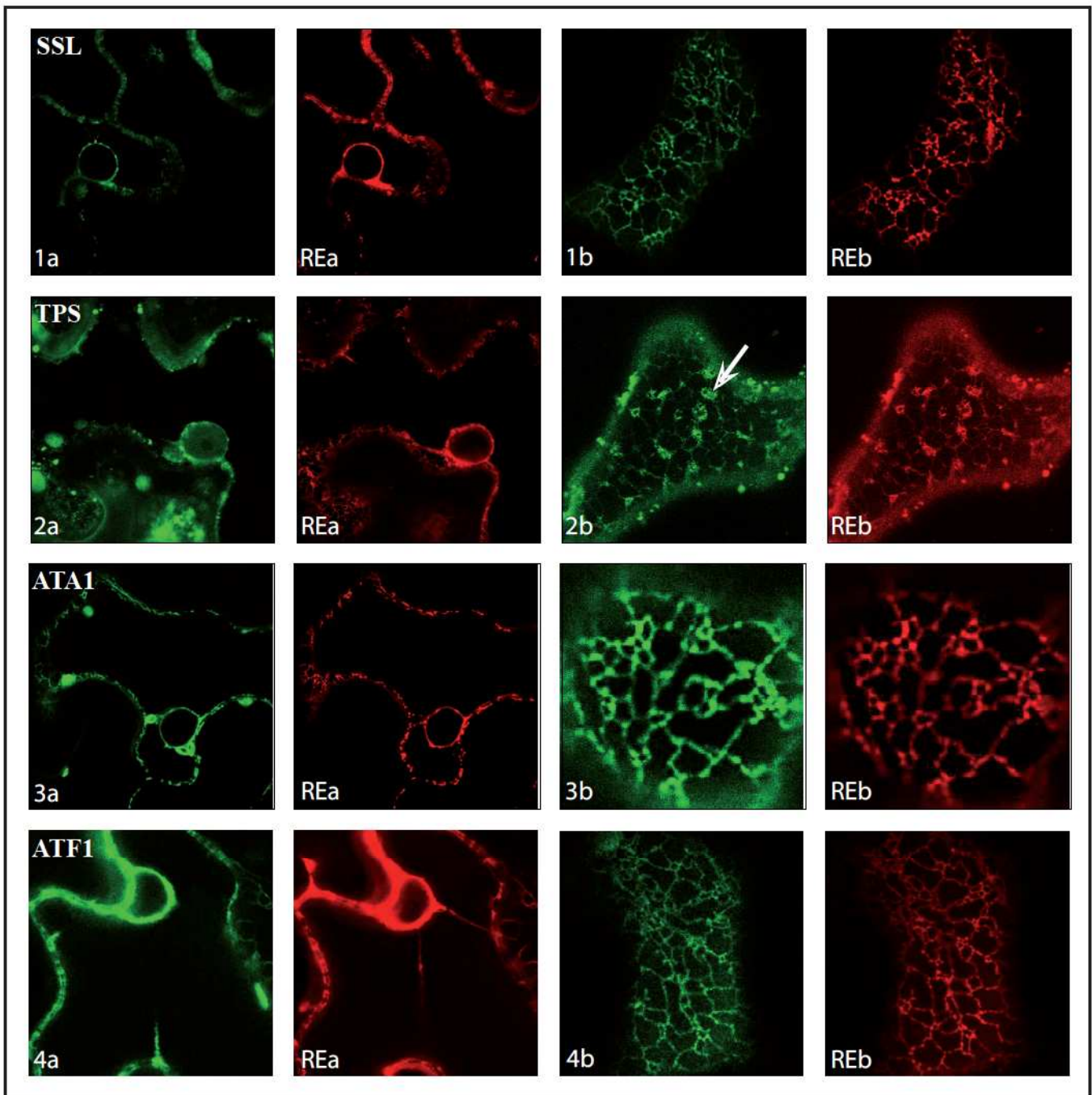


Figure III.17 Localisation subcellulaire des protéines codées par les gènes *At3g59530* (*SSL*), *At4g20420* (*TPS*), *At3g42960* (*ATA1*) et *At1g03390* (*ATF1*) par fusion en C-terminal au fluorochrome rapporteur GFP.

Les observations au microscope confocal ont été réalisées sur des feuilles de *Nicotiana benthamiana* co-exprimant transitoirement les protéines de fusion SSL-eGFP (1) ou TPS-eGFP (2) ou ATA1-eGFP (3) ou ATF1-eGFP (4) avec un marqueur du RE couplé au fluorochrome RFP (RE). Un plan focal intracellulaire (a) et cortical (b) sont présentés pour chaque protéine. Les observations montrent que les différentes protéines sont localisées au niveau du RE. La protéine TPS est également présente dans des vésicules émanant du RE (flèche blanche 2b).

Contribution à l'identification d'autres acteurs intervenant dans la synthèse de la paroi pollinique

observation au microscope confocal a permis de constater que les protéines ATF1, ATA1, TPS et SSL sont également associées au RE (figure III.17). Elles interviennent donc probablement dans un métabolisme associé au RE et ainsi potentiellement dans la voie métabolique que nous avons décrit. Étonnamment, la protéine TPS présente un second marquage très particulier. Celle-ci semble s'accumuler au sein de vésicules dérivées du RE perturbant par la même le marquage témoin du RE utilisé lors de l'expérience. Par contre, la protéine MS2, qui réduit l'acyl-ACP en alcool, est plastidiale (Shi et al., 2011).

J'ai confirmé ces observations pour la protéine ATA1. Au moyen d'anticorps polyclonaux spécifiques, j'ai réalisé une immunolocalisation sur coupes ultrafines en microscopie électronique à transmission dans les mêmes conditions que pour les protéines ACOS5, PKS et TKPR. Les résultats indiquent que la protéine ATA1 est bien localisée sur le RE du tapétum (figure III.18). Les résultats sont compatibles avec un rôle des protéines ATF1, ATA1, TPS et SSL dans la biosynthèse de l'exine.

4. Etude de l'implication des protéines ATA1 et ATF1 dans la formation de la paroi pollinique

4.1. Caractérisation de l'expression spatiotemporelle des gènes *ATF1* et *ATA1*

Parmi les différents gènes étudiés, nous nous sommes concentrés sur les gènes *ATA1* et *ATF1* pour lesquels on pouvait formuler des hypothèses d'activité enzymatique. En effet, *ATA1* est classée dans la famille des oxydoréductases et pourrait être impliquée dans la formation de fonctions réactives impliquées dans la polymérisation des précurseurs de la sporopollénine. *ATF1* est une acyltransférase de la famille des BAHD et pourrait par exemple transférer une partie phénylpropanoïde sur la partie lipidique du monomère de sporopollénine. Afin d'appréhender la fonction de ces gènes, une caractérisation de l'expression spatiotemporelle a été entreprise.

J'ai ainsi utilisé le gène rapporteur β -Glucuronidase (GUS) pour déterminer l'expression tissulaire du gène *ATF1*. Les 2 kb précédant l'ATG initiateur ont été clonés en amont de la séquence codante de la GUS dans le plasmide pGBWFS7. La construction a été utilisée pour transformer *Arabidopsis*. L'analyse des lignées transgéniques a montré une expression spécifique des jeunes bourgeons (figure III.19a). Afin de caractériser plus précisément l'expression du gène, les bourgeons floraux ont été inclus dans de la paraffine et coupés au microtome. L'observation au microscope optique montre que les protéines sont

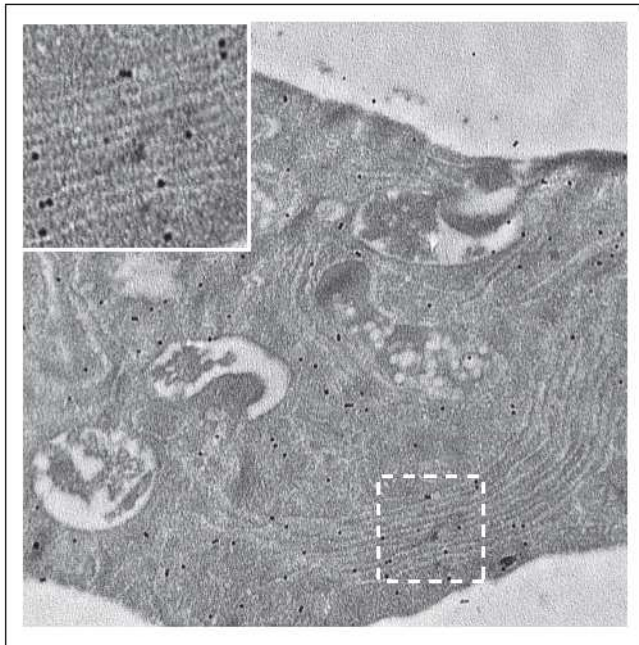


Figure III.18 Immunodetection de la protéine ATA1 au niveau subcellulaire dans les étamines sauvages.

L'immunolocalisation de la protéine ATA1 a été réalisée au moyen d'anticorps spécifiques sur des coupes ultrafines de bourgeons inclus dans de la résine LR white. Un agrandissement est présenté en haut à gauche.

On constate une localisation de la protéine ATA1 sur le RE, similaire à celle des enzymes de la voie de biosynthèse de la sporopollenine.

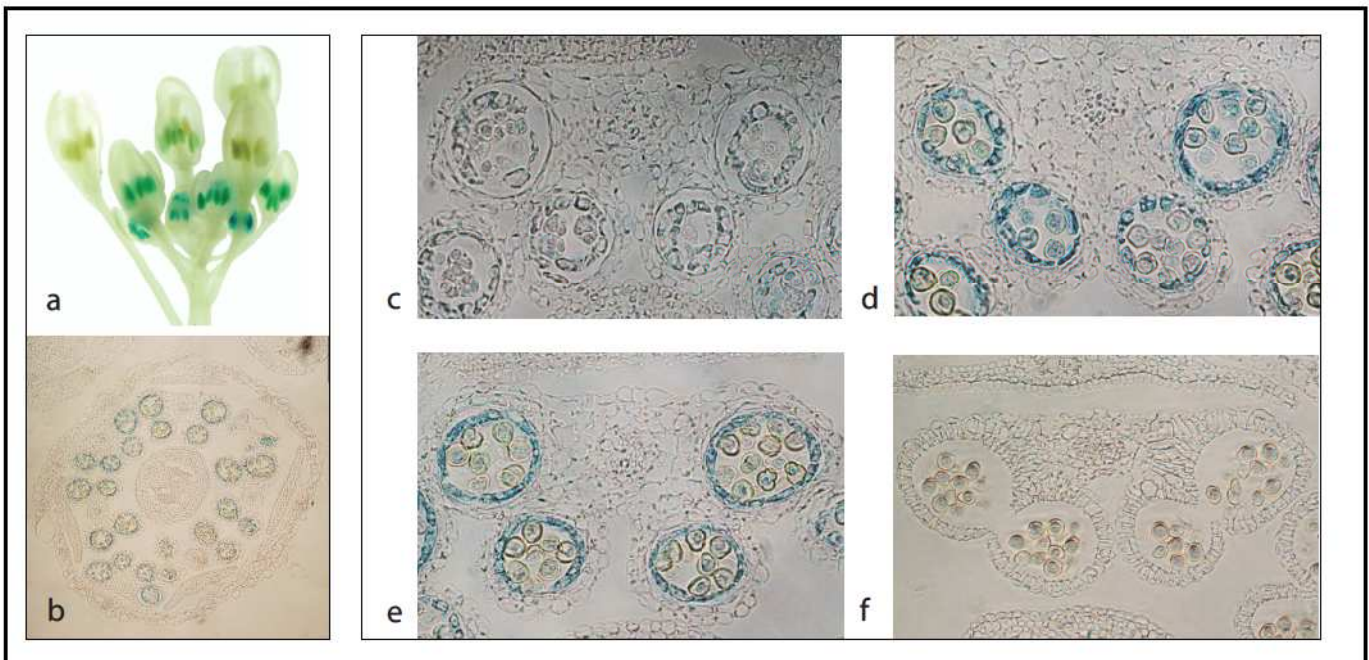


Figure III.19 Localisation spatiotemporelle de l'activité β -Glucuronidase (GUS) sous le contrôle du promoteur du gène *ATF1* dans les cellules du tapetum et grains de pollen des inflorescences d'*Arabidopsis*.

Les colorations histochimiques GUS ont été réalisées sur des inflorescences de plantes transformées par la construction *pATF1::GUS* puis observées à la loupe binoculaire (a) et au microscope suite à une étape de fixation et d'inclusion (b-f). Différents stades de développement sont présentés. c ; tétrade, d ; microspore unicellulaire, e ; microspore bicellulaire, f ; microspore tricellulaire.

La coloration bleue due à l'activité GUS montre que le gène *ATF1* est exprimé dans les cellules du tapetum et microspores des jeunes bourgeons. Son expression débute à la fin du stade tétrade (c), atteint un maximum au stade de microspore unicellulaire (d) puis stoppe avant la dégénérescence du tapetum (e-f).

Contribution à l'identification d'autres acteurs intervenant dans la synthèse de la paroi pollinique

spécifiques des cellules du tapétum. L'expression semble débiter à la fin du stade tétrade et atteindre un maximum lors du stade microspore unicellulaire puis la coloration disparaît avant la dégénérescence du tapétum (figure III.19b-f). Une coloration bleue ponctuée est également visible sur les grains de pollen.

Pour compléter cette étude, j'ai réalisé une expérience d'hybridation pour localiser l'expression des gènes *ATF1* et *ATA1*. Pour cela, j'ai inclus des bourgeons floraux dans de la paraffine et réalisé des coupes transversales et longitudinales. Ces coupes ont ensuite été mises en présence de sondes ARN sens (témoin négatif pour vérifier la spécificité de la coloration) ou antisens (sonde qui s'hybride à l'ARNm). L'observation après coloration confirme l'expression des gènes au stade tétrade avec un maximum au stade microspore unicellulaire (figure III.20).

Dans l'ensemble, ces profils d'expression des ARNm et protéines *ATA1* et *ATF1* sont en accord avec une implication dans la synthèse de précurseurs de sporopollénine.

4.2. Quelques éléments sur les activités enzymatiques des protéines recombinantes

La protéine *ATA1* appartient à la grande famille des « short-chain déshydrogénases/reductases » (SDR). Celle-ci est présente dans tous les organismes séquencés à ce jour et les protéines sont impliquées dans le métabolisme d'un grand nombre de composés lipidiques dont les hormones stéroïdes. Toutes ces enzymes possèdent un domaine de Rossmann de fixation au NAD/NADP. Une analyse par comparaison de séquence indique que cette protéine est probablement une alcool déshydrogénase et présente de fortes similarités avec *STA1* (pour *Silene tapetum*, protéine exprimée dans le tapétum de *Silene latifolia* et annotée comme oxydoréductase) ou encore des similarités avec *Tasselseed 2* (*TS2*, une hydroxystéroïde déshydrogénase du maïs). *TS2* est une 3 β / 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénase NAD⁺ dépendante qui permet la formation d'une fonction hydroxyle à partir d'une fonction cétone (ou inversement) sur un cycle à 5 ou 6 carbones. *In vitro*, elle est également capable d'agir sur d'autres lipides. Exprimée dans les méristèmes floraux, les travaux les plus récents suggèrent qu'elle permet la synthèse d'une hormone végétale essentielle du développement floral (Wu et al., 2007). *STA1* est une protéine spécifique du tapétum de *Silene latifolia* mais sa fonction est inconnue. Les hypothèses pour l'activité d'*ATA1* sont donc nombreuses. Elle pourrait agir sur la fonction cétone du noyau lactone des

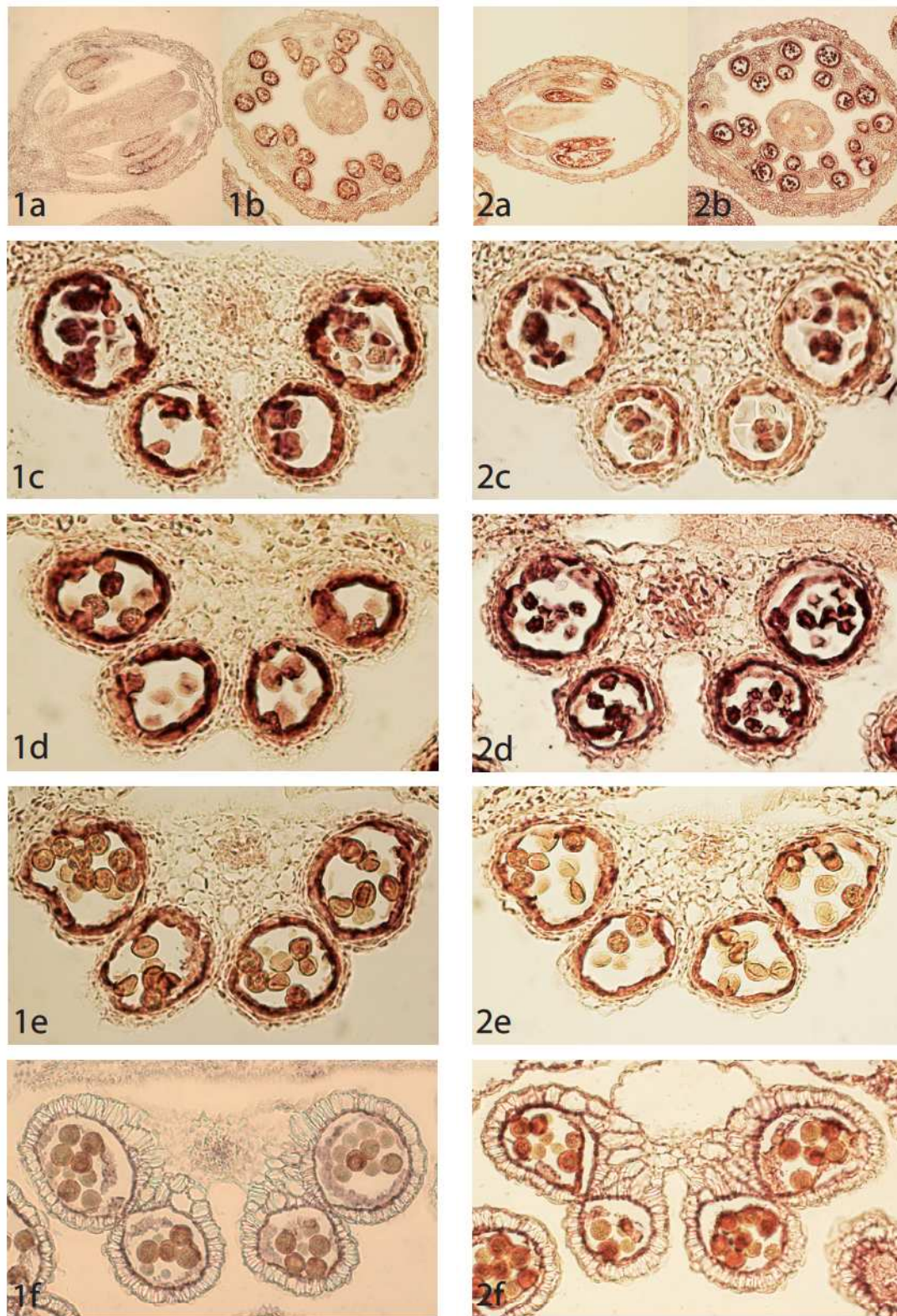


Figure III.20 Localisation de l'expression des gènes *ATAI* (*At3g42960*) (1) et *ATF1* (*At1g03390*) (2) par hybridation in situ.

Coupes longitudinales (a) et transversales (b) de bourgeons floraux à différents stades de développement hybridés avec une sonde antisens spécifique du gène *At3g42960* (1) ou *At1g03390* (2). Des coupes de ces mêmes bourgeons hybridées avec la sonde sens n'ont montré aucun marquage (non présenté). Des coupes de bourgeons issus des mutants *ata1* et *aft1* ont été hybridées avec la sonde sens et n'ont montré aucun marquage (non présenté). Quatre stades de développement sont présentés : c, tétrade; d, microspore unicellulaire; e, microspore bicellulaire; f, microspore tricellulaire.

Les observations révèlent une expression des deux gènes dès le stade tétrade (c) avec un maximum au stade microspore unicellulaire (d).

Contribution à l'identification d'autres acteurs intervenant dans la synthèse de la paroi pollinique

polykétides pour former une fonction hydroxyle ou agir sur les acides gras hydroxylés (estérifiés au CoA ou non) et former des diacides.

J'ai incubé ATA1 en présence d'esters de CoA d'acides gras ω -C16OH et C18OH hydroxylé en position 12 et recherché des produits oxygénés ou réduits. L'analyse par LC-MS/MS a permis de constater une disparition de l'ester de CoA mais sans pouvoir identifier le produit de la réaction (résultat non présenté).

Le gène *ATF1* appartient à la superfamille des acyltransférases de type BAHD. L'acylation est une réaction de substitution ou de transfert d'un groupement acyle d'une molécule donneuse sur une molécule acceptrice par une substitution nucléophile. Un doublet d'électron libre de l'accepteur attaque une liaison activée du donneur d'acyle (figure III.21) permettant ainsi une transacylation.

La liaison thioester de l'ester de CoA est riche en énergie ce qui favorise la transacylation sur l'hétéroatome de la molécule acceptrice portant le doublet d'électrons libres. Le plus souvent il s'agit d'un atome d'azote, d'oxygène ou de soufre, la transacylation aboutit ainsi à la formation d'une liaison ester, amide ou thioester sur l'accepteur.

Il a été observé que la nature de l'hétéroatome de la molécule acceptrice n'est pas spécifique à une famille d'acyltransférase à la différence du groupe partant. Les acyltransférases de la famille des BAHD possèdent un motif HXXXD près du centre de la protéine et utilisent donc des donneurs d'acyles activés par le CoA. Parmi cette superfamille 5 clades ont été mis à jour grâce à des études phylogénétiques. De façon intéressante, dans un clade donné, les enzymes ont le même type de donneurs pour substrat. Le gène *ATF1* fait partie d'un sous-clade proche du clade E qui est spécifique du transfert de phénylpropanoïdes sur différents accepteurs (figure III.22). Dans ce même clade on trouve le gène *At5g41040* dont la protéine ASFT (Aliphatic Suberin Feruloyl Transferase) est impliquée dans le transfert de l'acide férulique sur un acide gras lors de la synthèse de la subérine (Gou et al., 2009; Molina et al., 2009). Les analyses chimiques avaient détecté la présence de résidus *p*-coumarique et férulique au sein du polymère de sporopollénine. La protéine ASFT possédant 66% d'identité avec celle codée par le gène *At1g03390*, j'ai dans un premier temps testé le transfert des composés *p*-coumaroyl-CoA et Feruloyl-CoA sur les acides gras ω -C16OH et C18OH hydroxylé en C12. Le résultat de l'incubation a été analysé par chromatographie. Aucun produit de transacétylation n'a pu être détecté (résultats non montrés).

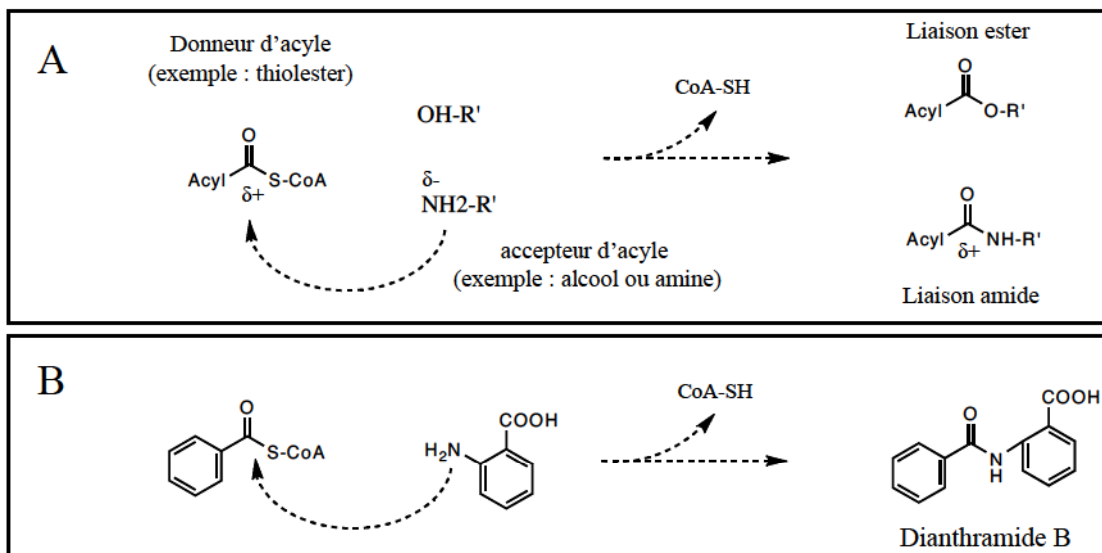


Figure III.21 La réaction de transacylation catalysée par les acyltransférases.

(A) Dans cet exemple théorique, le donneur d'acyle est activé par un coenzyme A. Le doublet d'électrons libres du receveur est porté par un atome d'oxygène ou d'azote et attaque la liaison riche en énergie. Cette réaction de substitution conduit à la formation d'une liaison ester ou amide.

(B) Exemple de réaction catalysée par l'Anthranilate Hydroxycinnamoyl/Benzoyl Transférase (HCBT) de *Dianthus caryophyllus* conduisant à la formation de dianthramide B.

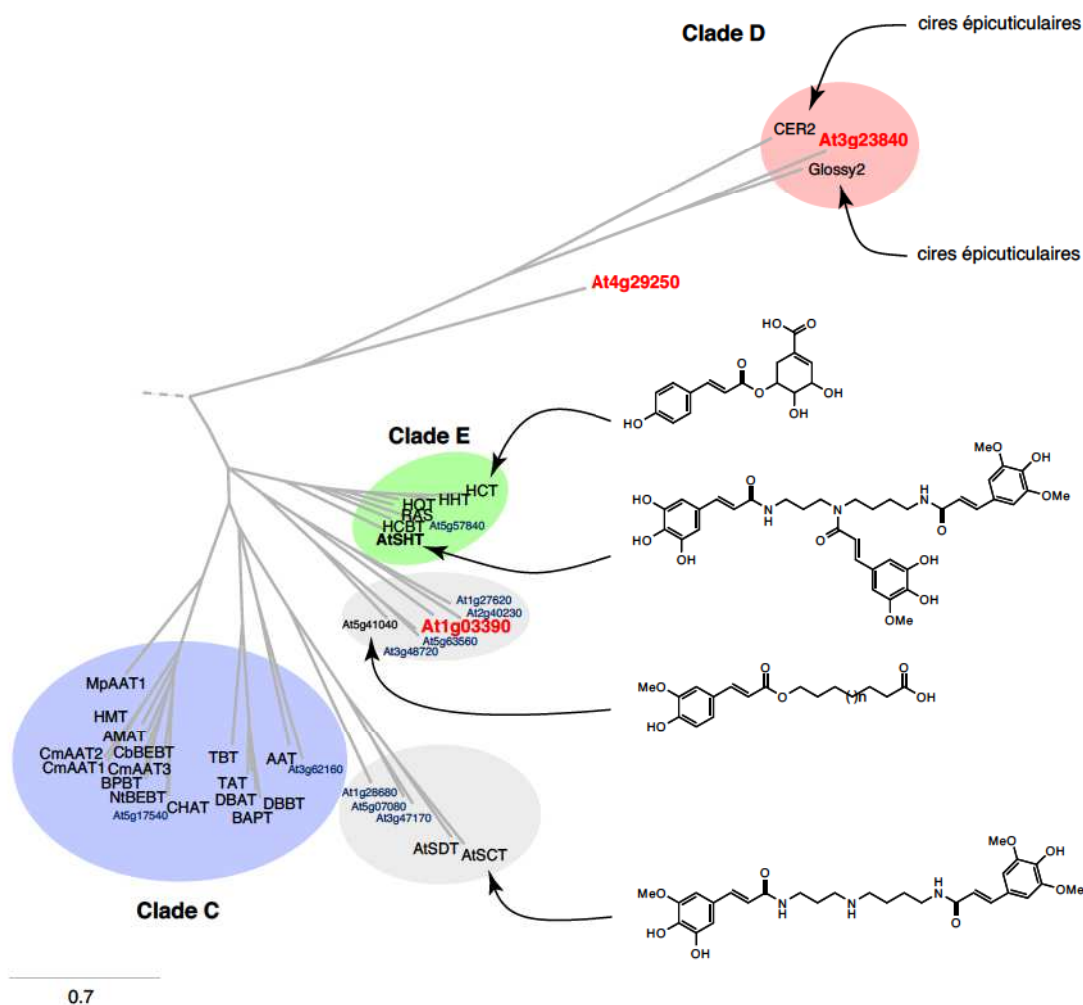


Figure III.22 Contexte phylogénétique de la protéine ATF1 parmi d'autres acyltransférases de type BAHD exprimées dans les bourgeons floraux.

Vue partielle de l'arbre phylogénétique des acyltransférases BAHD parmi lesquelles At1g03390, At4g29250 et At3g23840 (en rouge) sont exprimées dans les bourgeons floraux d'*Arabidopsis*. Celles caractérisées sont indiquées en noir et certains des produits formés sont indiqués.

Contribution à l'identification d'autres acteurs intervenant dans la synthèse de la paroi pollinique

Une autre possibilité était que l'enzyme transfère ces mêmes composés sur un des polykétides. En effet, lorsqu'ils sont formés à partir d'acides gras hydroxylés, le trikétide contient une fonction hydroxyle et le tétrakétide deux. Ces produits ont été synthétisés enzymatiquement à partir des esters de CoA d'acides gras ω -C16OH et C18OH hydroxylés en C12. Les esters de CoA d'acides gras ont alors été condensés par les enzymes PKSA ou PKSB avec 2-3 unités de malonyl-CoA radiomarqué pour former les polykétides hydroxylés. Puis l'acyltransférase et les composés *p*-coumaroyl-CoA et féruloyl-CoA ont été ajoutés et incubés pendant une heure. Comme précédemment, aucun produit n'a pu être détecté après chromatographie. Donc ni pour ATA1, ni pour ATF1 la nature exacte de l'activité catalytique n'a pu être caractérisée bien que leur rôle dans la biosynthèse de la sporopollénine soit très probable.

DISCUSSIONS ET PERSPECTIVES

Identification des substrats et produits formés par les polykétides synthétases et réductases

D'un point de vue biochimique, notre travail a montré que, *in vitro*, les PKSA et PKSB forment des trikétides et tétrakétides α -pyrones par condensation décarboxylative d'esters de CoA d'acides gras et de malonyl-CoA. Ceux-ci constituent alors de possibles substrats pour les TKPR1 et TKPR2 qui réduisent la fonction cétone de la chaîne aliphatique en fonction alcool secondaire. Ce travail révèle la participation inédite de polykétides α -pyrones dans la composition de la sporopollénine. Ces unités constituent de nouveaux composés végétaux formés par les polykétides synthétases en plus des chalcones, stilbènes, acridones et phloroglucinols déjà décrits (Austin and Noel, 2003; Flores-Sanchez and Verpoorte, 2009). Cependant, les PKS acceptant des acyl-CoAs de longueur variable pour substrats *in vitro*, la nature exacte de leur substrat physiologique reste inconnue, et pourrait également être multiple. Un profil métabolique des anthères des mutants *pksa*, *pk sb* et *pk sa pk sb* a montré une diminution de l'abondance en flavonoïdes et d'après les expériences de Dobritsa, les enzymes présentent une activité CHS (Dobritsa et al., 2010). *In vitro*, nous avons réussi à démontrer une préférence de substrats des PKS pour des acides gras hydroxylés et dans l'optique de confirmer ces résultats, et de définir la longueur de la chaîne des acides gras utilisés *in vivo* ainsi que leur degré d'hydroxylation ou d'insaturation, j'ai cherché à caractériser les produits et substrats de ces enzymes *in planta*.

Pour ce faire, il faut tenir compte des spécificités de substrats de chaque enzyme de la voie de biosynthèse où les protéines PKSA et PKSB sont impliquées. Notre travail a montré que, *in vitro*, les protéines PKSA ou PKSB catalysent préférentiellement la condensation d'esters de CoA d'acides gras hydroxylés qui pourraient être formés séquentiellement par les CYP703A2 (Morant et al., 2007), CYP704B1 (Dobritsa et al., 2009b) et ACOS5 (de Azevedo Souza et al., 2009). Etant donné que ces enzymes acceptent des acyl-CoAs de longueur de chaîne variable pour substrats, j'ai cherché à caractériser l'accumulation de substrats ou la disparition des produits chez les mutants. Cette expérience a permis de détecter de l'érucamide au sein d'étamines sauvages à la différence des étamines *pk sa* et *pk sb* ou *pk sa pk sb*. Ce résultat n'a sans doute pas de rapport direct avec l'activité des enzymes PKSA et PKSB puisqu'elles ne peuvent être impliquées directement dans la synthèse de ce métabolite. A ce stade de notre étude, il est difficile d'interpréter ce résultat.

Séquence biosynthétique de la voie de production des précurseurs de sporopollénine

La recherche de substrats des PKS dans les étamines a permis de révéler l'accumulation de métabolites dans les anthères du mutant *pksa pksb* en comparaison de celles d'une plante sauvage ou du mutant *acos5*. Leur masse et leur temps d'éluion sont semblables à ceux d'acides gras C16OH, C16diOH et C18OH. Ce résultat suggère d'une part que ces métabolites correspondent à des produits pouvant être formés par des réactions en amont des PKS et impliquent les CYP703A2 et CYP704B1. Leur absence au sein des étamines *acos5* signifie que l'enzyme ACOS5 estérifie les acides gras avant qu'ils ne soient hydroxylés par les CYP450. L'absence des acides gras hydroxylés chez *acos5* indique que les acides gras libres ne sont pas hydroxylés *in vivo*, contrairement à ce qui a été observé *in vitro* (Dobritsa et al., 2009b; Morant et al., 2007). Des problèmes de reproductibilité et de sensibilité des analyses LC/MS-MS ont empêché leur caractérisation par l'étude de leur spectre de fragmentation. Mais il s'agit d'un résultat qui mérite d'être précisé pour confirmer la nature des substrats *in vivo* des PKS.

Pour mieux appréhender la séquence biosynthétique exacte, les enzymes CYP703A2 ont été mises en présence soit d'esters de CoA d'acides gras, soit de polykétides formés par les PKS à partir de ces mêmes esters de CoA, afin de tester si CYP703A2 était capable d'hydroxyler les polykétides. Il a dans un premier temps été constaté qu'en présence d'esters de CoA, CYP703A2 était capable de former des acides gras hydroxylés. Cependant, les microsomes de levure qui portent CYP703A2 contiennent des thioestérases capables d'hydrolyser les esters de CoA. L'activité d'hydroxylation de la CYP703A2 constatée a donc pu avoir lieu sur les esters de CoA ou les acides gras libérés. Pour répondre à cette question, nous avons tenté d'inhiber cette activité d'hydrolyse par l'ajout de tétrahydrolipstatine (Orlistat, produit dérivé de la lipstatine, bloqueur naturel des lipases pancréatiques) à la réaction enzymatique, mais ceci n'a pu empêcher l'hydrolyse des esters de CoA. A l'avenir, il serait intéressant de tester l'activité d'hydroxylation sur des esters de CoA non hydrolysables pour établir si les CYP703A2 et CYP704B1 sont capables ou non d'utiliser des esters de CoA formés par ACOS5.

Dans un second temps, en présence de trikétides et tetrakétides formés par PKSA, l'hydroxylation de polykétides par la CYP703A2 n'a pu être observée. Ces derniers résultats

confirment que les PKSA et PKS_B utilisent les esters de CoA d'acides gras préalablement hydroxylés.

En résumé, les PKSA et PKS_B utilisent préférentiellement des esters de CoA d'acides gras hydroxylés formés par l'action séquentielle de ACOS5 et des CYP703A2 et CYP704B1. La nature exacte des produits n'a pu être identifiée *in planta* pour l'instant, mais le fait que les enzymes TKPR1 et 2 soient capables de réduire les tétrakétides suggère que ces produits sont bien ceux formés par PKSA et PKS_B même si toutes les enzymes de la voie de biosynthèse n'ont pas encore été identifiées. Les esters de CoA substrats peuvent comporter d'autres fonctions que les hydroxyles introduits par les CYP703A2 et CYP704B1, ce qui expliquerait pourquoi les produits et substrats n'ont pu être identifiés en recherchant les masses des produits putatifs. Mais pour pouvoir mettre en évidence l'accumulation des produits, il faut que les intermédiaires soient solubles et qu'ils ne soient pas substrats d'une autre voie de biosynthèse. Enfin, la quantité de matériel disponible est limitante. Une soixantaine d'étamines d'*Arabidopsis* ne représente que quelques milligrammes de matériel dans lesquels les cellules du tapétum ne constituent qu'une très faible proportion. De plus, les précurseurs de sporopollénine sont formés en continu et ce en quelques heures chez *Arabidopsis*. Il se pourrait que l'accumulation des produits ou substrats recherchés ne soit pas suffisante pour permettre une caractérisation. Enfin, on ne peut exclure qu'il existe un rétrocontrôle négatif par lequel l'accumulation limitée de substrats liée à une mutation dans la voie biosynthétique entraîne une extinction de certaines étapes en amont.

Mise en évidence d'un métabolon ancré sur le RE et intervenant dans la synthèse des monomères de sporopollénine

La synthèse des précurseurs de sporopollénine, leur transport et leur intégration dans l'exine par polymérisation autour de centaines de grains de pollen ne nécessite que quelques heures. Les rendements de biosynthèse au sein des cellules du tapétum doivent être élevés et cette efficacité pourrait nécessiter une organisation particulière des enzymes de la voie de biosynthèse sous la forme d'un complexe multiprotéique. Ce mode d'association a été rapportée pour plusieurs métabolismes et a été désignée par le terme de « métabolon ». En concentrant les différentes enzymes d'une voie de biosynthèse dans un espace restreint, les intermédiaires de biosynthèse sont transférés d'un site actif au suivant sans être dilués dans le

cytosol. Les concentrations en substrats sont donc optimales, ce qui permet une catalyse efficace du substrat en produit. Cette organisation nécessite une relocalisation des substrats, co-facteurs et enzymes en un même lieu et au même instant. Les enzymes ACOS5, CYP703A2, CYP704B1, PKSA, PKSB et TKPR1, dont l'expression est étroitement co-régulée dans le temps et co-localisée dans les cellules du tapétum, interviennent dans une même voie de synthèse. Ces caractéristiques suggéraient l'existence possible d'une organisation en métabolon. L'organisation subcellulaire de la voie de biosynthèse a ainsi été étudiée en localisant d'abord les enzymes dans les cellules du tapétum, puis en testant l'existence d'interactions.

Les protéines ont été localisées au niveau du RE en système hétérologue par l'expression de protéines de fusion avec la GFP dans un système hétérologue, les feuilles de *Nicotiana benthamiana*. Puis la localisation a été étudiée par immunomarquage au sein du tapétum, leur site natif d'expression. Les résultats ont alors confirmé que dans les cellules du tapétum, au moment de la formation de la paroi pollinique, les protéines PKSA, PKSB et TKPR1 sont localisées au niveau du RE à l'inverse de TKPR2 qui est cytoplasmique. Les séquences caractéristiques d'une ancre membranaire, d'un peptide signal ou d'un site de prénylation ne sont pas présentes dans ces protéines, la relocalisation de ces protéines à la surface du RE est donc sans doute la conséquence d'une réorganisation cellulaire basée sur les interactions protéine-protéine. La faible proportion de protéine cytosolique détectée pourrait résulter de protéines nouvellement synthétisées en train d'être dirigées vers un métabolon en formation. Cette proportion pourrait aussi illustrer la notion d'interactions dynamiques qui règnent au sein du métabolon. En conclusion, cette co-localisation subcellulaire des protéines sur le RE appuie la possible formation d'un métabolon à la surface du RE.

Une expérience de subfractionnement a permis de séparer des fractions contenant tapétosomes et élaïoplastes ou simplement le RE dans le but de purifier le complexe multiprotéique au sein de la fraction contenant les membranes de RE. Nous avons constaté que seule une faible proportion de ces protéines était entraînée par les microsomes, mais la majeure partie est restée parmi les protéines solubles. Ceci démontre que les interactions entre les différentes protéines associées au RE sont faibles.

Les expériences de His-pull down et de double hybride dans quelques cas ont montré l'existence d'interactions entre les couples de protéines ACOS5-PKSA, ACOS5-PKSB, ACOS5-TKPR1, PKSA-TKPR1 et PKSB-TKPR1 mais jamais entre une de ces protéines et TKPR2. Ces interactions ont ensuite été confirmées *in planta* par des mesures de FLIM-FRET. L'expérience de FLIM-FRET réalisée avec CYP704B1 a montré son importance dans

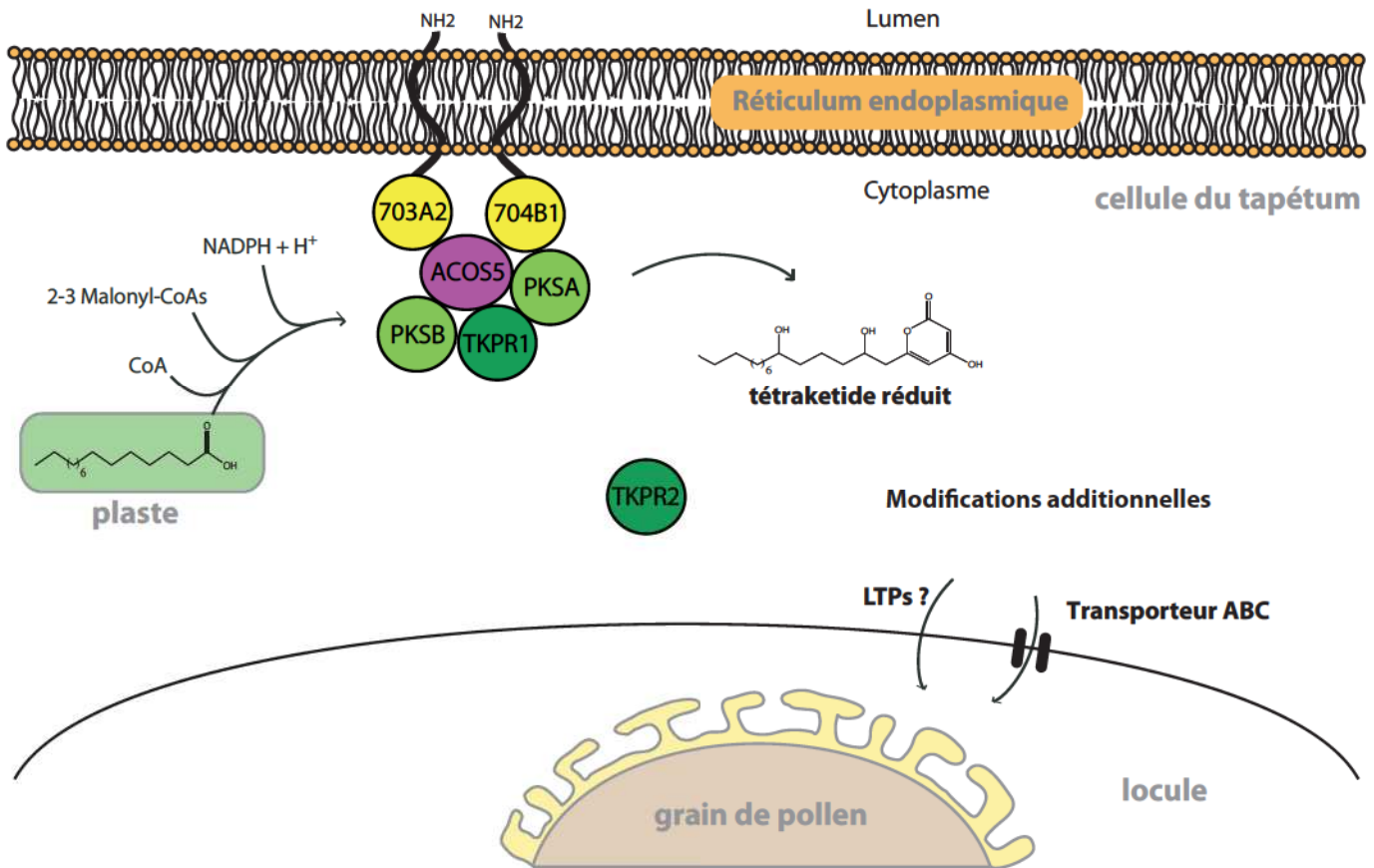


Figure IV.1 Modèle actualisé de la voie de biosynthèse de sporopollénine.

Notre stratégie combinant des approches génomiques, transcriptomiques, métabolomiques et biochimiques, et des techniques immunologiques a permis d'identifier une voie biosynthétique majeure de la formation du polymère de sporopollénine. Les protéines CYP703A2, CYP704B1, ACOS5, PKSA, PKSB et TKPR1 constituent ce métabolite conservé au sein des angiospermes et permettant la formation de composés α -pyrone hydroxylés qui entrent dans la composition de la sporopollénine. Des modifications supplémentaires de ces composés sont possibles. Le transport des monomères de sporopollénine jusqu'à la paroi ainsi que leur mode de polymérisation restent des énigmes.

l'ancrage du métabolon au RE puisque celle-ci interagit aussi avec les protéines ACOS5, PKSA, PKSB et TKPR1. Cette CYP450 apparaît donc comme une pierre angulaire du métabolon.

L'ensemble des résultats permet d'établir un nouveau modèle cellulaire de la voie de biosynthèse de sporopollénine sous la forme d'un métabolon (figure IV.1). Les mécanismes engagés dans le recrutement des différents partenaires sur le RE et ceux impliqués dans le maintien des liaisons entre protéines demeurent inconnus mais semblent conservés au sein des plantes. En effet, il est intéressant de constater qu'au sein des feuilles de *Nicotiana benthamiana*, les protéines PKSA, PKSB et TKPR1 ont également été localisées à proximité du RE en l'absence des CYP703A2 et CYP704B1 qui sont spécifiquement produites dans les cellules du tapétum. Existe-t-il une séquence d'adressage au RE encore non identifiée ou des métabolons suffisamment similaires pour permettre l'intégration de ces protéines ? Ces questions méritent d'être soulevées et leur étude ouvrirait de nouvelles perspectives sur le rôle des CYP450 non identifiés dans l'architecture du métabolon.

Les polykétides synthétases PKSA et PKSB et les réductases TKPR1 et TKPR2 ont des rôles différents dans la synthèse de la paroi pollinique

Grâce aux données apportées par des analyses chimiques (Ahlers et al., 2003; Dominguez et al., 1999), génétiques et biochimiques (de Azevedo Souza et al., 2009; Morant et al., 2007), notre connaissance de la structure et de la composition de la sporopollénine s'améliore. Ces études ont montré que les voies de biosynthèse d'unités lipidiques et phénoliques concourent à la formation du polymère de sporopollénine. Les analyses génétiques ont identifié un grand nombre de gènes qui interviennent dans la synthèse de cette paroi et nous avons caractérisé le rôle critique de deux polykétides synthétases, PKSA et PKSB, ainsi que de deux réductases, TKPR1 et TKPR2. La perte de fonction de l'une ou de l'autre des protéines PKSA ou PKSB entraîne une forte perturbation de l'exine et une diminution de la fertilité. Au premier abord, ces résultats soulèvent la question de l'existence d'une redondance de fonction comme suggérée par nos résultats d'analyses enzymatiques *in vitro*. Cependant les grains de pollen issus des simples mutants *pksa* et *pkbs* présentent un phénotype légèrement différent. L'exine des grains de pollen *pkbs* apparaît plus touchée que celle des grains de pollen *pksa* et cette différence se répercute sur l'épaisseur du manteau déposé à la surface du pollen (Dobritsa et al., 2010; Kim et al., 2010). Le phénotype sévère du double mutant *pksa pkbs* corrobore également cette observation. Ses grains de pollen sont

totalemment dénués d'exine et la plante est stérile. L'effet de la double mutation est donc plus fort que chaque simple mutation, ce qui démontre que dans les simples mutants l'effet de la mutation était atténué par l'activité de l'autre PKS. Une autre indication soutient des fonctions différentes pour PKSA et PKSB, notamment la différence observée dans leur profil d'expression, PKSB s'exprimant plus tôt que PKSA.

La mutation des gènes *TKPR1* ou *TKPR2* a un impact très différent sur l'exine. La dégénérescence des grains de pollen de la plante *tkpr1* a pour conséquence la stérilité de la plante alors que l'exine des grains de pollen du mutant *tkpr2* présente des défauts nettement plus légers sans impacter la fertilité. Ces résultats suggèrent qu'*in vivo*, ces deux réductases ont des fonctions différentes même si les tests enzymatiques ont montré qu'elles réduisent le même substrat *in vitro*, le tétrakétide α -pyrone. La localisation subcellulaire différente des deux enzymes est en faveur de cette hypothèse tout comme le fait que la protéine TKPR2 soit exprimée jusqu'au stade 12 de l'échelle de Sanders alors que TKPR1 n'est exprimée que jusqu'au stade 10 (Grienenberger et al., 2010). De plus, les tests d'interactions protéiques montrent que la protéine TKPR2 n'interagit pas avec les autres enzymes.

Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que *in vivo*, les protéines CYP703A2, CYP704B1, PKSA, PKSB et TKPR1 sont localisées au niveau du RE et sont capables d'agir séquentiellement sur différents dérivés d'acides gras. Elles pourraient donc former des métabolons ancrés au RE alors que TKPR2 serait impliquée dans la synthèse de précurseurs différents, mais essentiels pour la formation d'une exine fonctionnelle. Le fait que nous n'ayons pas pu identifier de substrats ou produits des enzymes étudiées dans les extraits métaboliques des mutants va dans ce sens. En effet, la quantité de substrats intermédiaires est probablement très faible et la perte d'une enzyme du complexe entraîne sa désorganisation et l'arrêt total de la synthèse de précurseurs. Seule l'abondance du substrat initial du métabolon ou du produit final est touchée par la mutation d'un des enzymes qui le forme. La mise à jour des intermédiaires de biosynthèse n'est peut-être pas techniquement possible. Enfin, la présence de partenaires protéiques au sein d'un complexe peut influencer l'activité enzymatique. Les produits formés *in vitro*, pourraient être différents de ceux formés *in vivo*.

Les acteurs identifiés pourraient former plusieurs métabolons, des plateformes modulables menant à des monomères variés

Les polykétides synthétases (PKS) sont réparties en trois classes selon leur structure. Celles de type III sont représentées parmi les plantes, champignons ou

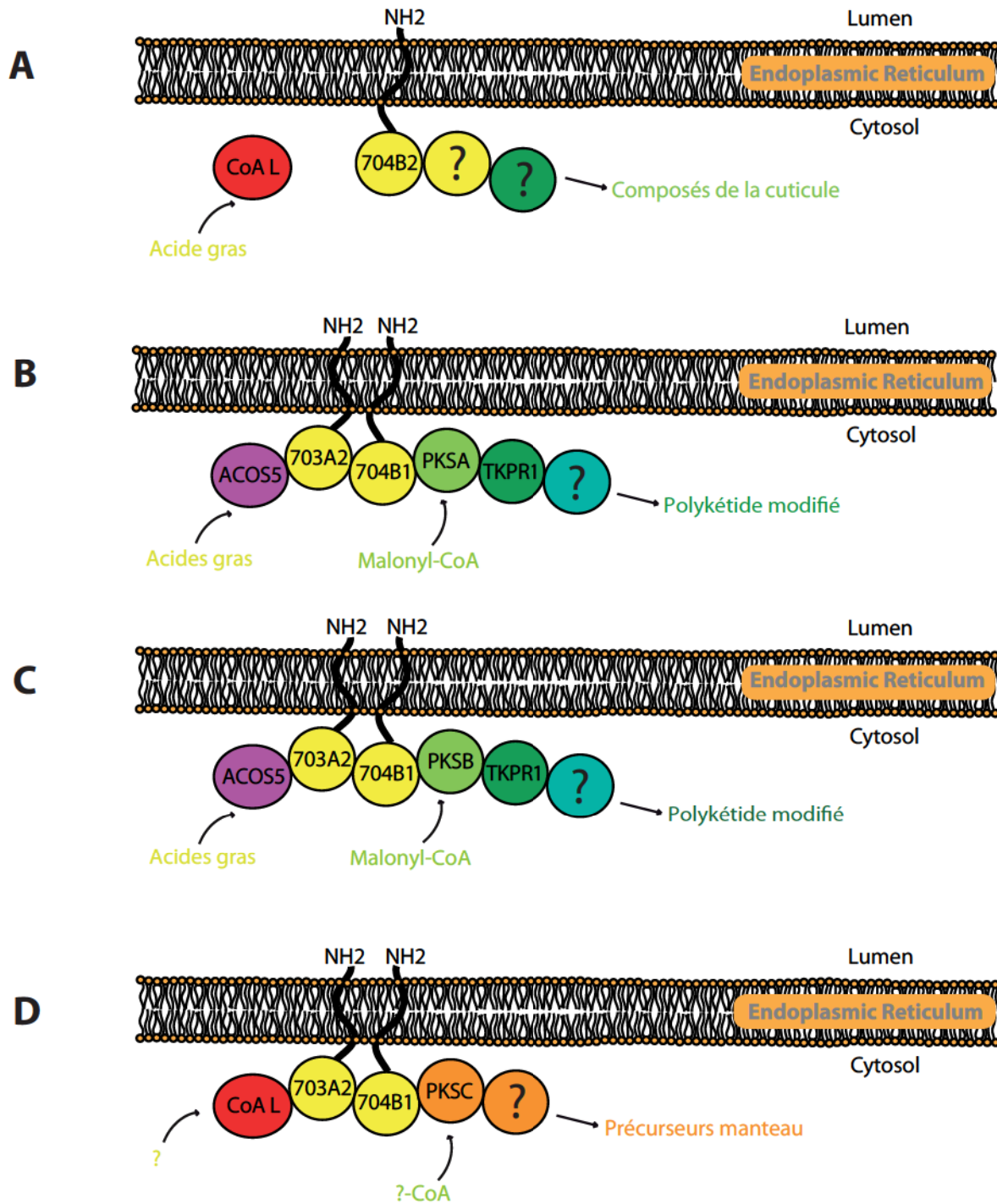


Figure IV.2. Organisation des métabolites pouvant se former et conduisant à la synthèse des précurseurs de la paroi pollinique et de la cutine.

Les enzymes sur fond de même couleur sont communes à plusieurs métabolites. Les enzymes marquées par un point d'interrogation restent à découvrir. Les cytochromes P450, protéines membranaires, sont enchâssés dans la membrane et ancrent le métabolite dans le RE. A: Biosynthèse des précurseurs de la cutine. B et C: Biosynthèse des précurseurs de la sporopollénine. D: Biosynthèse des précurseurs du manteau.

Ⓢ, enzyme hypothétique capable d'apporter une modification supplémentaire au monomère; CoA L, CoA ligase activatrice d'acides gras; CYP704B2, orthologue de la CYP704B1 chez le riz intervenant dans la synthèse de monomères de sporopollénine et de cutine.

bactéries et forment des homodimères alors que les PKS de type I et II forment de larges complexes multienzymatiques. Les résultats de FLIM-FRET ont confirmé ces propriétés en révélant que les protéines PKSA et PKSB interagissent entre elles pour former des homodimères et non des hétérodimères. Il apparaît donc que ces métabolons font intervenir des homodimères formés soit par PKSA soit par PKSB et conduisent peut-être à la synthèse d'unités de sporopollénine différentes. La différence de phénotype observée entre les mutants *pksa* et *pksb* serait ainsi expliquée.

Certains membres enzymatiques de ces métabolons pourraient être partagés. Les métabolons sont des complexes enzymatiques dynamiques dont les membres sont reliés par des liaisons faibles et non exclusives. Certains enzymes peuvent intervenir dans la synthèse de différents métabolites en fonction du tissu où ils sont exprimés. La protéine CYP704B2, un orthologue de la CYP704B1 chez le riz, est un exemple. L'analyse en microscopie électronique de coupes d'anthères a montré que la perte de fonction de la protéine CYP704B2 entraîne des défauts de formation à la fois de la cutine et de la sporopollénine. Ceci signifie que les acides gras hydroxylés qu'elle forme entrent dans la composition des deux polymères. Il apparaît donc que les enzymes que nous étudions pourraient former plusieurs métabolons à la façon des différentes branches des phénylpropanoïdes (figure I.21). Les enzymes CYP703A2 et CYP704B1 serviraient d'ancre membranaire aux différents métabolons impliqués dans la synthèse de précurseurs de sporopollénine et pourraient être communes (ou pas) à ceux-ci tout comme la protéine TKPR1 (figure IV.2). Au contraire, les protéines PKSA et PKSB ne seraient présentes que sur l'une des versions. Une complexification supplémentaire des substrats ou produits des PKS est imaginable et serait amenée par des enzymes à découvrir. Des transférases, par exemple, pourraient greffer d'autres motifs sur la chaîne lipidique.

Au sein des cellules du tapétum, ces métabolons pourraient également être impliquées dans la synthèse de composés impliqués dans des étapes plus tardives de la formation de la paroi pollinique. Lors de l'étude des *PKSA* et *PKSB*, un autre gène (*At4g00040*) à 79% similaire à *PKSA* a été identifié et la protéine nommée PKSC. Dans notre test, la protéine recombinante n'a pas montré d'activité de condensation des esters de CoA d'acides gras similaire aux *PKSA* et *PKSB* et ne peut compléter les mutants simples *pksa* ou *pksb* (Dobritsa et al., 2010). Elle est exprimée dans les anthères, mais plus tardivement que les protéines *PKSA* ou *PKSB* (expression maximale stade floral 11, lors de la formation des composés du manteau) et également dans d'autres organes. Elle semble donc intervenir dans la synthèse de composés différents, non spécifiques de la paroi pollinique. Les CYP703A2 et

CYP704B1 sont exprimées jusqu'au stade 12 du développement floral selon l'échelle de Smyth. Ces enzymes pourraient donc intervenir dans la production des lipides du manteau (de Azevedo Souza et al., 2009; Li et al., 2010; Morant et al., 2007; Yi et al., 2010). PKSC pourrait après la synthèse des précurseurs de sporopollénine, former un nouveau métabolite.

Contributions à l'identification d'autres acteurs intervenant dans la synthèse de la paroi pollinique

Gènes intervenant dans la synthèse de précurseurs de l'exine

Le gène *ATF1*

Sur la base de sa séquence, ATF1 est une acyltransférase putative appartenant à la superfamille des acyltransférases du type BAHD. Chez *Arabidopsis*, les analyses phylogénétiques la placent dans un clade constitué de transférases transférant un hydroxycinnamoyl-CoA sur un acide gras (figure III.22). Ces éléments suggèrent l'utilisation probable d'un substrat similaire par ATF1 et son implication dans un métabolisme lié aux dérivés d'acides gras et phénylpropanoïdes, ce qui est compatible avec sa localisation au niveau du réticulum endoplasmique.

L'étude de l'expression du gène chez *Arabidopsis* a révélé un niveau d'expression faible localisé dans les cellules du tapétum lors de la formation de la paroi pollinique (du stade tétrade au stade microspore bicellulaire). De façon intéressante, le patron d'expression d'ATF1 se superpose avec celui des autres enzymes du métabolite et sa mutation entraîne des défauts de formation de l'exine (figure III.15, 19 et 20). Ces observations suggèrent l'intervention d'ATF1 dans un métabolisme associé à la synthèse de la paroi pollinique. Le patron de dépôt de l'exine n'est pas altéré chez *atf1*, mais les grains de pollen sont collés les uns aux autres et une proportion importante de grains de pollen s'effondrent sur eux-mêmes, révélant une faiblesse de la paroi pollinique comparée au sauvage. Comment des défauts de formation peuvent conduire à une formation d'agrégats ? L'effet peut être direct, causé par des irrégularités du tectum ou par une quantité ou qualité anormale des composants de la sporopollénine qui entraînent une modification des propriétés d'interaction de l'exine. L'effet peut aussi être indirect, causé par exemple par une variation de l'abondance de certains composés du manteau qui ne peuvent s'adsorber sur une exine imparfaite. Tout comme la cutine permet d'éviter la fusion entre différents organes lors de leur développement (Samuels et al., 2008), un manteau imparfait pourrait conduire à l'agrégation de grains de pollen.

Dans la subérine, ce sont les cires qui sont responsables de la non-déshydratation des tissus. Dans la paroi pollinique, une exine imparfaite pourrait entraîner une déshydratation des grains de pollen et un effondrement de ceux-ci. L'acyltransférase pourrait ainsi être impliquée dans la formation d'esters entre acides hydroxycinnamiques et acides gras. Le profil d'expression de l'enzyme et sa surexpression chez le mutant *ms1* (facteur de transcription connu pour réprimer l'expression des gènes précoces dans la formation de la paroi pollinique), va dans ce sens. Différents tests peuvent être conduits afin de tester la capacité de l'enzyme à transférer un acide hydroxycinnamoyl sur divers acides gras. Cependant, l'approche de la fonction de ATF1 par la détermination de son activité enzymatique n'a pas donné de résultats, peut-être parce que les bons substrats n'ont pas été testés.

Pour avoir une idée de la conservation du gène chez les plantes, les homologues à *ATF1* ont été recherchés dans les bases de données. Des homologues sont retrouvés depuis les bryophytes jusqu'aux angiospermes avec plus de 60% d'identité au sein des dicotylédones. Ces résultats soulignent une apparition précoce du gène au cours de l'évolution et la conservation de sa fonction dans la synthèse de l'exine.

Le gène *ATA1*

Des similarités de séquence rapprochent *ATA1* de déshydrogénases ayant une action sur des hormones stéroïdes et divers composés lipidiques. L'étude d'immunolocalisation spatio-temporelle a révélé une expression spécifique dans les cellules du tapétum semblable à celle d'autres enzymes de la biosynthèse de la sporopollénine, c'est à dire du stade tétrade au stade microspore bicellulaire. Son expression en fusion avec la protéine GFP a permis de la localiser au niveau du réticulum endoplasmique. Ces éléments sont compatibles avec une implication dans un métabolisme lié aux dérivés d'acides gras et de phénylpropanoïdes. Cependant, les différents tests d'activité imaginés pour *ATA1* ont tous été négatifs. L'incubation de l'enzyme recombinante avec un ester de CoA d'acide gras conduit systématiquement à la libération d'une partie de l'acide correspondant par rupture de la liaison thioester. Cette activité thioestérase peut être le signe que l'enzyme a pour substrat un ester de CoA mais son activité enzymatique exacte reste à déterminer. Un rôle associé à la synthèse de la sporopollénine est suggéré par l'agrégation des grains de pollen ou la faiblesse de la paroi chez le mutant qui entraîne leur effondrement sur eux-mêmes, certainement causé par les irrégularités du tectum observées (figure III.15). L'enzyme pourrait donc avoir un rôle en aval du métabolite identifié dans la synthèse des précurseurs de la sporopollénine et influencer la qualité des composants de la sporopollénine. Le fait qu'une partie seulement des

grains de pollen soient mal formés semble indiquer qu'une autre enzyme est capable de remplir cette fonction, mais n'est pas suffisante pour assurer la formation de la paroi de tous les grains de pollen.

Le gène *SSL*

SSL est une des 15 protéines de la famille des strichtosidine synthétases présentes chez *Arabidopsis thaliana*. Ces protéines partagent 26-39% d'identité avec la STR1 (*Rauvolfia serpentina* strictosidine synthase) qui condense la tryptamine à la sécologanine. Chez les plantes supérieures, cette réaction est à l'origine d'un grand nombre d'alcaloïdes. SSL présente un feuillet β et certaines cystéines de STR1, mais les résidus du site actif de la STR1 sont absents chez SSL. Une activité enzymatique du type strichtosidine synthétase semble donc douteuse. Dobritsa et al. (Dobritsa et al., 2009a) ont comparé le profil métabolique du mutant *ssl* à celui d'une plante sauvage et ont détecté la disparition d'un alcane, le nonacosane et d'un flavonoïde, la naringenine chalcone. La localisation de SSL à proximité du RE et l'analyse des grains de pollen de la plante mutante suggèrent bien une implication dans la formation de la paroi pollinique. Des analyses *in silico* montrent que des protéines dans diverses espèces végétales présentent un fort pourcentage d'identité avec SSL d'*Arabidopsis*. De façon intéressante, la perte de fonction de la protéine orthologue dans le riz entraîne des défauts de formation de la paroi pollinique (Cigan et al., 2001; Fox et al., 2001) indiquant que les homologues identifiés pourraient jouer un rôle identique dans la formation de l'exine.

Transport et polymérisation de précurseurs

Le gène *TPS*

Durant le développement pollinique, la sporopollénine initialement sensible à une acétolyse γ devient résistante (Southworth, 1974). Ce « durcissement » est également visible lors de l'observation de coupes de grains de pollen en microscopie électronique lorsque l'exine devient plus dense aux électrons. Le phénotype du mutant *tps* pourrait confirmer cette hypothèse puisque seule la formation du tectum semble touchée. Mais la véritable fonction biologique de TPS reste mystérieuse car aucun motif caractéristique n'est identifiable par des analyses de similarités de séquences. Cependant, les analyses des mutants et de localisation subcellulaire suggèrent une implication dans la voie de biosynthèse des précurseurs de sporopollénine. Staiger et al., (Staiger et al., 1994), ont montré que les protéines TAP35 et

TAP44 (homologues de TPS chez *Sinapis alba*) sont présentes à la fois dans les cellules du tapétum, dans le locule et au sein de l'exine. Ces protéines contiennent une séquence N-terminale riche en acides aminés hydrophobes servant de signal de sécrétion. La présence de la protéine TPS dans des vésicules associées au RE (figure III.17) suggère que la protéine est également sécrétée. La protéine TPS pourrait être impliquée dans le transport de précurseurs ou dans leur polymérisation.

Le mécanisme de transport de précurseurs de la sporopollénine du RE à la paroi pollinique reste pour une grande part inconnu. On sait qu'il implique un transporteur ABC. Des vésicules d'une densité aux électrons similaire à l'exine ont été observées au sein des cellules du tapétum de plantes mutées pour le transporteur ABCG26 (Choi et al., 2011; Quilichini et al., 2010). L'observation de coupes d'étamines *tps* au microscope électronique n'a cependant révélé aucune anomalie (résultats non présentés).

La recherche de séquences homologues dans d'autres espèces révèle que la protéine est présente chez *Sinapis alba*, *Brassica napus*, *Brassica rapa* et *Brassica oleracea*. TPS semble donc spécifique des Brassicacées et a donc un rôle dans un processus qui leur est spécifique. On remarque que ces plantes produisent toutes des grains de pollen dont le tectum relie les baculae formant un patron semblable à une cote de maille. Cette structure leur est spécifique. Divers logiciels de prédiction de localisation subcellulaire prédisent une localisation spécifique du RE ou une exécution. Ces données sont compatibles avec un rôle dans la mise en place du tectum. L'établissement d'un profil d'expression temporel et subcellulaire précis au cours du développement pollinique par exemple avec des plantes exprimant le gène rapporteur pTPS-GUS et par immunolocalisation devrait préciser le rôle de la protéine dans la formation de l'exine. La protéine ne possédant pas de site catalytique identifiable, elle pourrait servir de co-facteur à une enzyme de polymérisation ou bien de site de nucléation pour le polymère. Des tests d'interaction entre la protéine TPS et des précurseurs connus pourraient être envisagés.

Utilisation des mutants *ms1* et *AtMYB103* comme outils prédictifs

MS1 et AtMYB103 sont tous deux des régulateurs transcriptionnels. AtMYB103 agirait en amont et semble activer un groupe de gènes du métabolisme lipidique impliqués dans la formation de l'exine. MS1 serait impliqué dans la répression des gènes impliqués dans la formation de l'exine et dans l'activation des gènes formant le manteau pollinique. Une régulation différentielle de l'expression d'un gène observée entre une plante sauvage et *ms1*

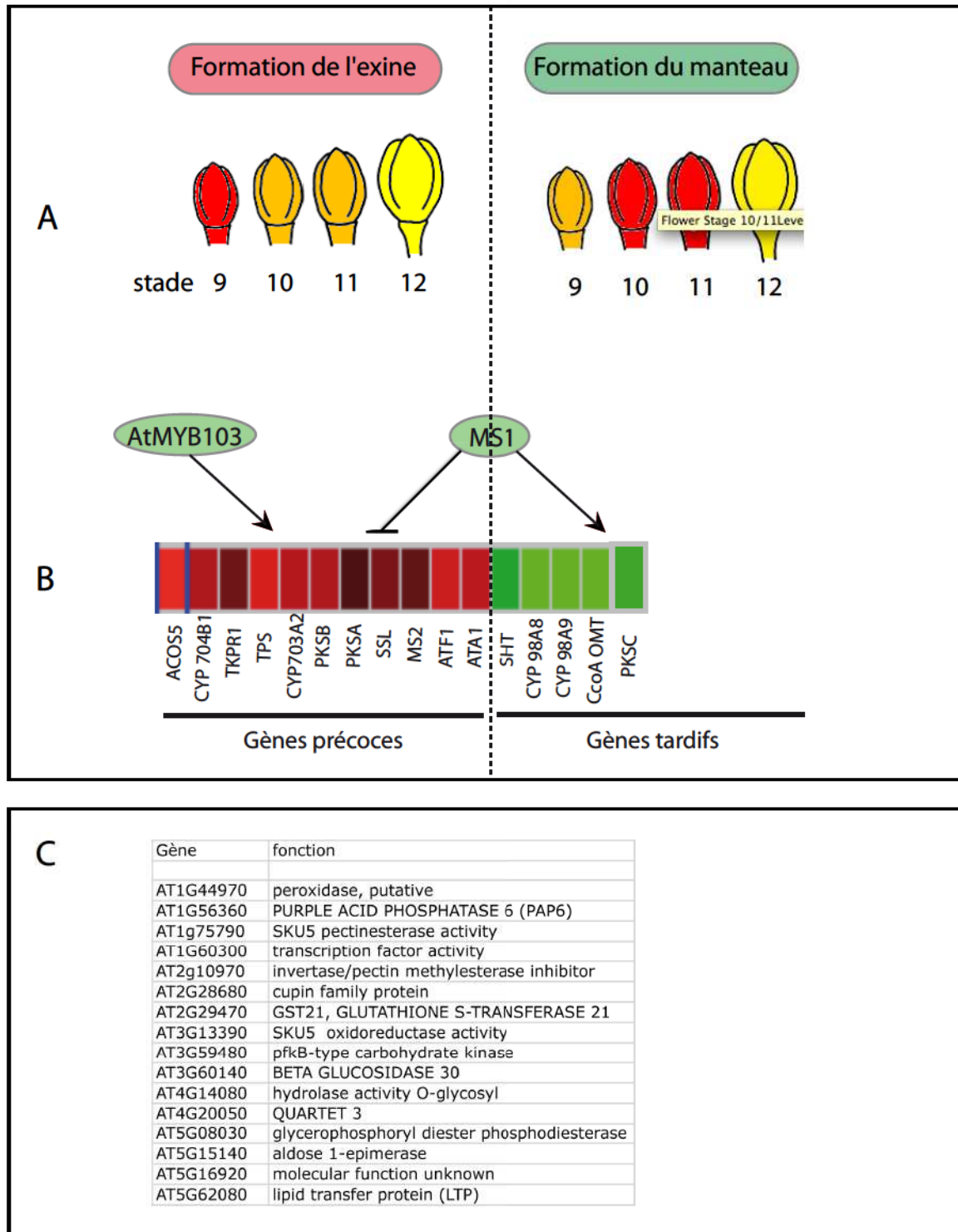


Figure IV.3 Utilisation des facteurs de transcription MS1 et AtMYB103 comme outils de prédiction

A. Représentation du profil d'expression de gènes impliqués dans la formation de l'exine ou du manteau pollinique

B. Influence de la mutation du facteur de transcription MS1 sur l'expression des gènes dont nous avons entrepris l'étude. → rôle activateur; —| rôle inhibiteur. Une case rouge signifie que le gène est réprimé par MS1 et surexprimé chez le mutant *ms1* par rapport au sauvage. Une case verte signifie que le gène est activé par MS1 et sous-exprimé chez le mutant *ms1*. AtMYB103 est impliqué dans l'activation d'un grand nombre de gènes du métabolisme lipidique.

C. Gènes co-régulés à ACOS5, réprimés chez *ms1* et putativement impliqués dans la synthèse de la sporopollenine

ou *atmyb103* indiquerait une expression spécifique dans les cellules du tapétum lors de la formation de l'exine ou du manteau. Les gènes *PKSA*, *PKSB*, *TKPR1* et *TKPR2* par exemple sont réprimés par MS1, alors que des gènes impliqués dans la formation du manteau comme *SHT*, *CYP98A8* et *CYP98A9* sont activés (figure IV.3). Ces deux facteurs de transcription pourraient donc servir de marqueur pour identifier d'autres acteurs intervenant dans la formation de l'exine. D'autres expériences de pêche des promoteurs ou de simple hybride pourraient confirmer le lien entre facteur de transcription et gène régulé. Ces expériences pourraient permettre d'identifier de nouveaux acteurs impliqués dans la formation de la paroi pollinique.

Les polykétides, des monomères aux propriétés de polymérisation intéressantes

Les propriétés d'un polymère sont dépendantes des monomères qui le forment et des liaisons engagées. Le polymère de sporopollénine est particulier, tout comme les polykétides qui le composent sont différents des acides gras linéaires. Ils possèdent un noyau lactone et une chaîne aliphatique. Différentes études ont montré que les éthers cycliques sont polymérisés de façon concomitante à l'ouverture du cycle (Peeters et al., 2005; Sutthasupa et al., 2010) et que ces polymérisations peuvent être médiées par des enzymes comme des lipases. Prenons l'exemple du polymère de caprolactone qui est formé par polymérisation en chaîne (figure IV.4). L'action d'un catalyseur (molécule chargée ou site actif d'une enzyme) active un monomère par ouverture du cycle. Le monomère chargé constituera alors un centre réactif capable de former une liaison avec un second monomère et ainsi de suite. Ce type de synthèse présente l'avantage de former rapidement de longs polymères dont la longueur est contrôlée. Un polymère formé selon ce procédé à partir de tétrakétides hydroxylés présenterait un réseau de chaînes carbonées portant des fonctions cétones et hydroxyles libres. Ces fonctions confèrent un fort potentiel de réticulation du polymère car ces fonctions sont susceptibles de former des liaisons éthers ou esters rigidifiant le polymère en liant des composés phénoliques ou en permettant la formation de liaisons hydrogènes entre les chaînes aliphatiques. Le fait que CYP703A2 hydroxyle préférentiellement les acides gras en position 7 permet la formation d'un polymère branché dont les chaînes latérales seront régulièrement espacées. Des liaisons éthers ou esters avec des phénylpropanoïdes seraient responsables de la rigidité et résistance du polymère à la dégradation chimique.

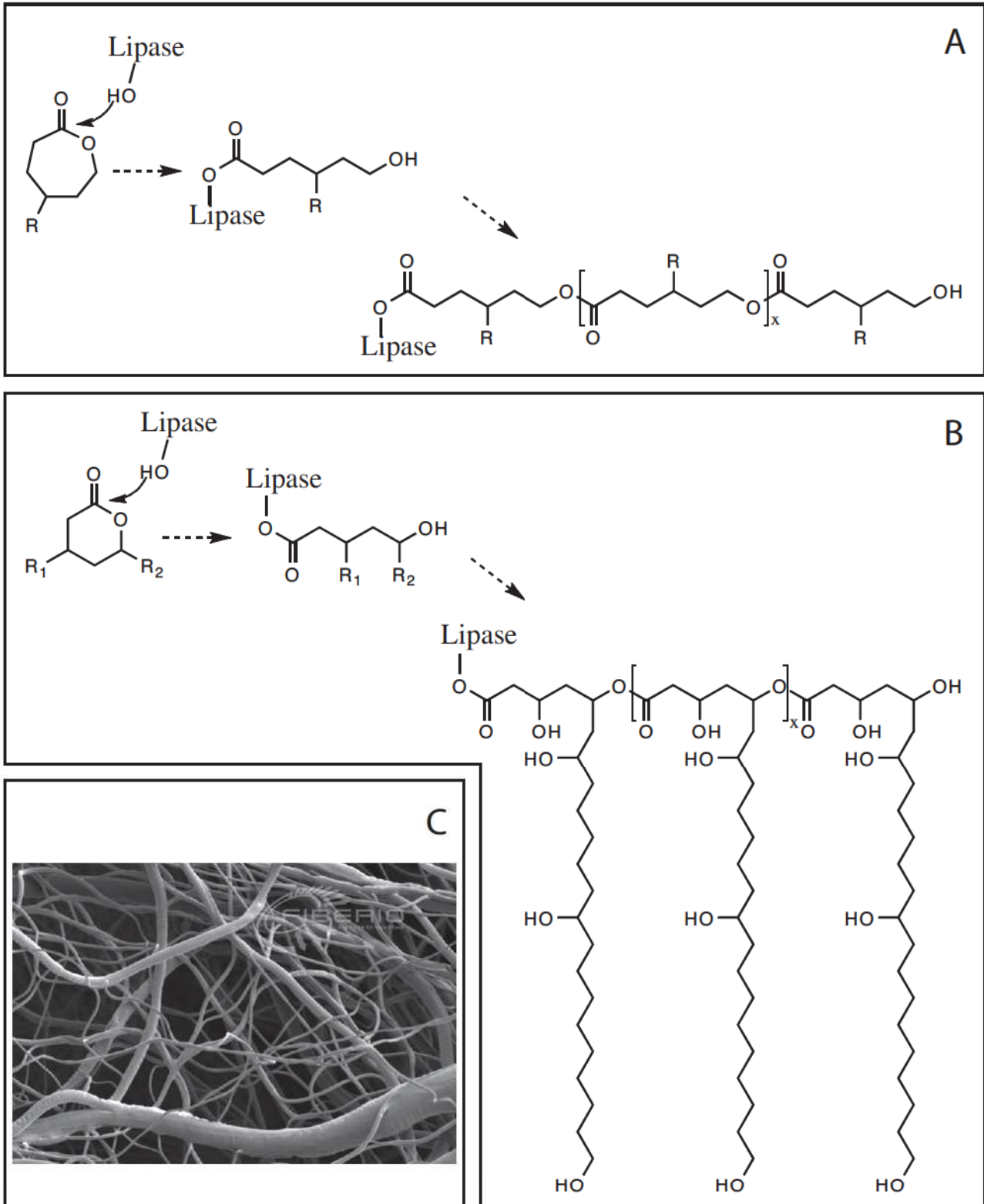


Figure IV. 4 La polymérisation par ouverture de cycle appliquée aux polykétides.

A. Modélisation de la polymérisation des lactones (ici le ϵ -caprolactone) par ouverture du cycle lactone catalysée par une lipase. La fonction ester du noyau lactone subit une attaque nucléophile qui permet l'ouverture du cycle. L'arrivée d'un autre monomère dans le site actif permet de régénérer le site actif de l'enzyme tout en formant une liaison ester avec le monomère linéaire formé. La répétition de cette réaction permet la formation d'un polymère de caprolactones.

B. Application de la polymérisation par ouverture de cycle lactone au tétrakétide réduit par TKPR1 et portant des hydroxylations médiées par les CYP703A2 et CYP704B1. Le polymère formé est branché de façon régulière. Les fonctions hydroxyles permettent la formation de liaisons hydrogènes interchaînes ou de liaisons ester avec d'autres composés de la paroi pollinique.

C. Polymère de caprolactone observé en microscopie électronique à balayage (source : FIBERIO)

Les peroxydases ou lipases co-régulées aux protéines du métabolisme pourraient être à l'origine de l'ouverture des cycles lactones et les acyltransférases à l'origine de transferts de composés phénoliques sur les fonctions réactives libres (figure III.1 et figure IV.3.C).

Enfin, l'accumulation de matériel dense aux électrons au sein du locule des anthères des mutants *pksa pksb* montre que les produits formés par les PKS sont nécessaires à une polymérisation normale à la surface du pollen. En effet, en leur absence, chez les mutants, une polymérisation anarchique conduit à la formation d'un matériel insoluble visible en microscopie électronique mais de nature inconnue.

Origine évolutive des parois

Il est à noter que des PKS sont impliquées dans la synthèse de lipides de paroi cellulaire bactériens (Funa et al., 2006; Hertweck, 2009). La paroi de *Mycobacterium tuberculosis*, qui fixe également l'Auramine-O, est par exemple constituée d'acides gras à très longue chaîne (jusqu'à C56) formés par des PKS. Des analyses métaboliques de la spore d'*Azotobacter vinelandii* montrent que les composés formant le cyste sont proches de ceux de l'exine et l'analyse de l'activité enzymatique des protéines codées révèle qu'elles synthétisent des tri- et tetrakétides similaires à ceux produits par PKSA et PKSB ainsi que des alkylrésorcinols (Funa et al., 2006). Il est donc à noter que la sporopollénine est associée à la protection des gamètes mâles chez les plantes, mais aussi des spores des bactéries. Initialement identifiée dans la paroi externe des spores des mousses et des bactéries, elle a été nommée sporine. Puis celle trouvée dans la paroi du pollen fut nommée pollénine. Par la suite, sporine et pollénine s'avérant similaires furent regroupées sous le terme de sporopollénine.

Nous avons montré que les gènes *CYP703A2*, *CYP704B1*, *ACOS5*, *PKSA*, *PKSB*, *TKPR1* et *TRKPR2* sont conservés chez de nombreuses plantes (angiospermes et gymnospermes) et chez la mousse *Physcomitrella patens*, mais pas dans les algues vertes comme *C. reinhardtii*. Ces gènes identifiés sont également exprimés dans les fleurs et sont donc très probablement les orthologues des protéines du métabolisme identifiées dans ce travail. D'un point de vue évolutif, la sporopollénine est ainsi apparue avant la lignine car elle est présente autour des spores de bryophytes qui ne sont pas lignifiés. L'absence de ces gènes dans les algues vertes démontre qu'ils sont apparus lors de l'adaptation des ancêtres des plantes à la vie terrestre.

Lors de cette transition, une des premières épreuves pour les plantes terrestres a été de protéger leurs spores et elles-mêmes de la déshydratation et des dommages causés par les UVs. On observe que les algues du groupe des charophytes (classe d'algue d'eau douce contenant potentiellement l'ancêtre commun des embryophytes) produisent des dérivés phénylpropanoïdes (Kroken et al., 1996). Ces métabolites, insérés dans la paroi polysaccharidique, conféraient un avantage sélectif de résistance aux UVs et ont permis à ces algues de coloniser des milieux terrestres humides. La présence de phénylpropanoïdes dans l'exine suggère que la voie métabolique conduisant à la formation des monomères de sporopollénine est apparue à partir de celle des phénylpropanoïdes.

Applications potentielles des travaux de recherches

La structure unique de la sporopollénine ainsi que la singularité de ses composants permet d'envisager différentes applications. L'encapsulation de cellules vivantes au sein de grains de pollen évidés pour la protection de probiotiques ou la délivrance de vaccins vivants est à l'étude (Hamad et al., 2011). L'industrie alimentaire s'intéresse également aux propriétés de ces microparticules pour former et stabiliser des émulsions (Dickinson, 2011). La présence de fonctions réactives à la surface de la paroi pollinique pourrait permettre une utilisation en tant que matrice à colonnes de chromatographie à échange ionique (Wenda et al., 2012) ou comme matrice permettant la fixation d'enzymes, de substrats ou d'anticorps (Ruddell et al., 2006). Les capacités du pollen de fixation aux métaux lourds en font un candidat possible pour combattre un empoisonnement (Maack, 2007). Ses fonctions antioxydantes pourraient également être utilisées pour la protection contre l'oxydation de médicaments lors de la délivrance (Atkin et al., 2010). Enfin, l'arrêt ciblé du développement des grains de pollen permettrait de contrôler la dispersion des plantes OGMs et ainsi de pouvoir les cultiver et étudier dans un cadre plus sécurisé (Goldberg et al., 1993). Ce polymère conférant une résistance exceptionnelle au pollen à divers stress mécaniques, à la déshydratation, aux UVs et à l'attaque par les agents pathogènes, ces recherches n'ont pas seulement un intérêt fondamental. A l'heure où l'utilisation de matériaux biosourcés et biodégradables est indispensable, ces connaissances pourraient être valorisées, par exemple par la génération de nouveaux bioplastiques, peintures et même produits pharmaceutiques. Le polycaprolactone a des propriétés proches des plastiques souples. Il est utilisé pour le modelage, comme film de paillage agricole, pots ou conteneurs de plantes et sacs poubelles. Les liaisons esters qu'il contient en font un polymère potentiellement biodégradable et il est

biocompatible. Il a aussi de nombreuses applications médicales dans les fils de sutures. Etant compatible avec un grand nombre de matériaux, il est également utilisé en tant qu'additif pour améliorer les propriétés d'autres polymères (en combinaisons avec des fibres de cellulose, il est un composant des produits pour incontinents ou tenues chirurgicales). Un polymère dérivé des sous-unités de la sporopollénine pourrait donc avoir des propriétés intéressantes.

Avant de penser à de telles applications, il serait intéressant de produire des monomères de polykétides en grande quantité et d'étudier les propriétés et applications possibles du polymère formé. Notre travail a montré que les enzymes PKSA et PKSB exprimées en système bactérien sont actives. Les cultures de bactéries pourraient ainsi être utilisées en tant que bioréacteur comme c'est le cas pour la synthèse de polycaprolactone. Un catalyseur de polymérisation à base d'octanoate d'étain utilisé pour des unités d' ϵ -caprolactone pourrait également être envisagé.

Nous avons observé que la perturbation de gènes impliqués dans la formation de cette paroi entraîne différents phénotypes soulignant la complexité des mécanismes de régulation du processus de fabrication de la paroi. L'ensemble des mutants caractérisés au cours de ces dernières années ouvre de nouvelles perspectives. Les mutants présentant un faible phénotype pourraient être croisés. L'impact sur le phénotype du double mutant pourrait alors renseigner sur la participation des différentes protéines dans la même voie de biosynthèse de sporopollénine ou dans deux voies métaboliques différentes. Ces mutants ouvrent également la route à un nouveau volet d'analyses de composition de paroi par dégradation ménagée. En effet, si ce type d'analyse n'a pu porter ses fruits sur une exine intacte, il serait utile de le tester sur une exine imparfaite et donc moins résistante à des traitements chimiques.

Ainsi, et d'une façon générale, la combinaison de techniques et approches complémentaires semble être la clef pour répondre aux nombreuses questions qui restent encore en suspens et permettra de faire de nouvelles avancées dans la compréhension de la formation de la paroi pollinique.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Aarts, M.G. et al.** (1997). The Arabidopsis MALE STERILITY 2 protein shares similarity with reductases in elongation/condensation complexes. *Plant J* **12**: 615–623.
- Achnine, L., Blancaflor, E.B., Rasmussen, S., and Dixon, R.A.** (2004). Colocalization of L-phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase for metabolic channeling in phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell* **16**: 3098–3109.
- Ahlers, F., Lambert, J., and Wiermann, R.** (2003). Acetylation and silylation of piperidine solubilized sporopollenin from pollen of *Typha angustifolia* L. *Z Naturforsch C* **58**: 807–811.
- Ahlers, F., Thom, I., Lambert, J., Kuckuk, R., and Wiermann, R.** (1999). H NMR analysis of sporopollenin from *Typha Angustifolia*. *Phytochemistry* **50**: 1095–1098.
- Albrecht, C., Russinova, E., Hecht, V., Baaijens, E., and de Vries, S.** (2005). The Arabidopsis thaliana SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASES1 and 2 control male sporogenesis. *Plant Cell* **17**: 3337–3349.
- Alexander, M.P.** (1969). Differential staining of aborted and nonaborted pollen. *Stain Technol* **44**: 117–122.
- Alves-Ferreira, M. et al.** (2007). Global expression profiling applied to the analysis of Arabidopsis stamen development. *Plant Physiol* **145**: 747–762.
- Ariizumi, T. et al.** (2004). Disruption of the novel plant protein NEF1 affects lipid accumulation in the plastids of the tapetum and exine formation of pollen, resulting in male sterility in Arabidopsis thaliana. *Plant J* **39**: 170–181.
- Ariizumi, T. et al.** (2003). A novel male-sterile mutant of Arabidopsis thaliana, faceless pollen-1, produces pollen with a smooth surface and an acetolysis-sensitive exine. *Plant Mol Biol* **53**: 107–116.
- Ariizumi, T., and Toriyama, K.** (2011). Genetic regulation of sporopollenin synthesis and pollen exine development. *Annu Rev Plant Biol* **62**: 437–460.
- Atalla, R.H., and Agarwal, U.P.** (1985). Raman microprobe evidence for lignin orientation in the cell walls of native woody tissue. *Science* **227**: 636–638.
- Atkin, S.L., Beckett, S.T., and Mackenzie, G.** (2010). Uses of sporopollenin. US patent No.7,846,654 B2
- Austin, M.B., and Noel, J.P.** (2003). The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. *Nat Prod Rep* **20**: 79–110.
- Aya, K. et al.** (2009). Gibberellin modulates anther development in rice via the transcriptional regulation of GAMYB. *Plant Cell* **21**: 1453–1472.

BIBLIOGRAPHIE

- Bartrina, I., Otto, E., Strnad, M., Werner, T., and Schmulling, T.** (2011). Cytokinin regulates the activity of reproductive meristems, flower organ size, ovule formation, and thus seed yield in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **23**: 69–80.
- Baucher, M., Monties, B., Montagu, M.V., and Boerjan, W.** (1998). Biosynthesis and genetic engineering of lignin. *Critical Reviews in Plant Sciences* **17**: 125–197.
- Bernard, A. et al.** (2012). Reconstitution of Plant Alkane Biosynthesis in Yeast Demonstrates That *Arabidopsis* ECERIFERUM1 and ECERIFERUM3 Are Core Components of a Very-Long-Chain Alkane Synthesis Complex. *Plant Cell*
- Bernards, M.A.** (2002). Demystifying suberin. *Can. J. Bot.* **80**: 227–240.
- Bernards, M.A., Summerhurst, D.K., and Razem, F.A.** (2004). Oxidases, peroxidases and hydrogen peroxide: The suberin connection. *Phytochemistry Reviews* **3**: 113–126.
- Bessire, M. et al.** (2011). A member of the PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE family of ATP binding cassette transporters is required for the formation of a functional cuticle in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **23**: 1958–1970.
- Bih, F.Y. et al.** (1999). The predominant protein on the surface of maize pollen is an endoxylanase synthesized by a tapetum mRNA with a long 5' leader. *J Biol Chem* **274**: 22884–22894.
- Bird, D. et al.** (2007). Characterization of *Arabidopsis* ABCG11/WBC11, an ATP binding cassette (ABC) transporter that is required for cuticular lipid secretion. *Plant J* **52**: 485–498.
- Boavida, L.C., Becker, J.D., and Feijo, J.A.** (2005). The making of gametes in higher plants. *Int J Dev Biol* **49**: 595–614.
- Boavida, L.C., and McCormick, S.** (2007). Temperature as a determinant factor for increased and reproducible in vitro pollen germination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **52**: 570–582.
- Boerjan, W., Ralph, J., and Baucher, M.** (2003). Lignin biosynthesis. *Annu Rev Plant Biol* **54**: 519–546.
- Bonawitz, N.D., and Chapple, C.** (2010). The genetics of lignin biosynthesis: connecting genotype to phenotype. *Annu Rev Genet* **44**: 337–363.
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248–254.
- Bubert, H., Lambert, J., Steuernagel, S., Ahlers, F., and Wiermann, R.** (2002). Continuous decomposition of sporopollenin from pollen of *Typha angustifolia* L. by acidic methanolysis. *Z Naturforsch C* **57**: 1035–1041.

BIBLIOGRAPHIE

- Buchanan, B. B., Gruissem, W., and Jones, R.L.** (2001). Biochemistry & molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists.
- Burbulis, I.E., and Winkel-Shirley, B.** (1999). Interactions among enzymes of the Arabidopsis flavonoid biosynthetic pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 12929–12934.
- Canales, C., Bhatt, A.M., Scott, R., and Dickinson, H.** (2002). EXS, a putative LRR receptor kinase, regulates male germline cell number and tapetal identity and promotes seed development in Arabidopsis. *Curr Biol* **12**: 1718–1727.
- Chen, W. et al.** (2011). Male Sterile2 encodes a plastid-localized fatty acyl carrier protein reductase required for pollen exine development in Arabidopsis. *Plant Physiol* **157**: 842–853.
- Choi, H. et al.** (2011). An ABCG/WBC-type ABC transporter is essential for transport of sporopollenin precursors for exine formation in developing pollen. *Plant J* **65**: 181–193.
- Cigan, A.M., Unger, E., Xu, R.J., Kendall, T., and Fox, T.W.** (2001). Phenotypic complementation of ms45 maize requires tapetal expression of MS45. *Sexual Plant Reproduction* **14**: 135–142.
- Clay, N.K., Adio, A.M., Denoux, C., Jander, G., and Ausubel, F.M.** (2009). Glucosinolate metabolites required for an Arabidopsis innate immune response. *Science* **323**: 95–101.
- Clément, C., Laporte, P., and Audran, J.C.** (1998). The loculus content and tapetum during pollen development in *Lilium*. *Sex Plant Reprod* **11**: 94–106.
- Clough, S.J., and Bent, A.F.** (1998). Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *Plant J* **16**: 735–743.
- Colcombet, J., Boisson-Dernier, A., Ros-Palau, R., Vera, C.E., and Schroeder, J.I.** (2005). Arabidopsis SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASES1 and 2 are essential for tapetum development and microspore maturation. *Plant Cell* **17**: 3350–3361.
- Czichi, U., and Kindl, H.** (1977). Phenylalanine ammonia-lyase and cinnamic acid hydroxylases as assembled consecutive enzymes on microsomal-membranes of cucumber cotyledons: Cooperation and subcellular-distribution. *Planta* **134**: 133–143.
- Davin, L.B., and Lewis, N.G.** (1991). Recent advances in phytochemistry. Plenum Press.
- Davin, L.B., and Lewis, N.G.** (2005). Lignin primary structures and dirigent sites. *Curr Opin Biotechnol* **16**: 407–415.
- de Azevedo Souza, C. et al.** (2009). A novel fatty Acyl-CoA Synthetase is required for pollen development and sporopollenin biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell* **21**: 507–525.
- Delwiche, C.F., Graham, L.E., and Thomson, N.** (1989). Lignin-Like Compounds and Sporopollenin Coleochaete, an Algal Model for Land Plant Ancestry. *Science* **245**: 399–401.

BIBLIOGRAPHIE

- Dickinson** (2000). Pollen coatings : chimaeric genetics and new functions. *Sexual plant reproduction* **12**: 302–309.
- Dickinson, E.** (2011). Use of nanoparticles and microparticles in the formation and stabilization of food emulsions. *Trends in Food Science & Technology* **24**: 4-12
- Dixon, R.A., and Paiva, N.L.** (1995). Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *Plant Cell* **7**: 1085–1097.
- Dobritsa, A.A. et al.** (2011). A large-scale genetic screen in *Arabidopsis* to identify genes involved in pollen exine production. *Plant Physiol* **157**: 947–970.
- Dobritsa, A.A. et al.** (2010). LAP5 and LAP6 encode anther-specific proteins with similarity to chalcone synthase essential for pollen exine development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **153**: 937–955.
- Dobritsa, A.A. et al.** (2009a). *LAP3*, a novel plant protein required for pollen development, is essential for proper exine formation. *Sex Plant Reprod* **22**: 167–177.
- Dobritsa, A.A. et al.** (2009b). CYP704B1 is a Long-chain Fatty Acid {omega}-Hydroxylase Essential for Sporopollenin Synthesis in Pollen of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **151**: 574–589.
- Dominguez, E., Heredia-Guerrero, J.A., and Heredia, A.** (2011). The biophysical design of plant cuticles: an overview. *New Phytol* **189**: 938–949.
- Dominguez, E., Mercado, J.A., Quesada, M.A., and Heredia, A.** (1999). Pollen sporopollenin: degradation and structural elucidation. *Sex. Plant Reprod.* **12**: 171–178.
- Dong, X., Hong, Z., Sivaramakrishnan, M., Mahfouz, M., and Verma, D.P.** (2005). Callose synthase (CalS5) is required for exine formation during microgametogenesis and for pollen viability in *Arabidopsis*. *Plant J* **42**: 315–328.
- Doughty, J., Hedderson, F., McCubbin, A., and Dickinson, H.** (1993). Interaction between a coating-borne peptide of the Brassica pollen grain and stigmatic S (self-incompatibility)-locus-specific glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 467–471.
- Ehlting, J. et al.** (1999). Three 4-coumarate:coenzyme A ligases in *Arabidopsis thaliana* represent two evolutionarily divergent classes in angiosperms. *Plant J* **19**: 9–20.
- Fengel, D., and Wegener, G.** (1984). Wood: chemistry, ultrastructure, reactions. *Journal of Polymer Science* **23**: 601-602.
- Fiebig, A., Kimport, R., and Preuss, D.** (2004). Comparisons of pollen coat genes across Brassicaceae species reveal rapid evolution by repeat expansion and diversification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 3286–3291.

BIBLIOGRAPHIE

- Flores-Sanchez, I.J., and Verpoorte, R.** (2009). Plant polyketide synthases: a fascinating group of enzymes. *Plant Physiol Biochem* **47**: 167–174.
- Fox, T.W., Trimnell, M.R., and Albertsen, M.C.** (2001). Cloning of Ms45, a gene required for male fertility from *Zea mays*. Trait and Technology Development, Pioneer Hi-Bred Intl. Inc.(direct submission)
- Franke, R. et al.** (2005). Apoplastic polyesters in *Arabidopsis* surface tissues--a typical suberin and a particular cutin. *Phytochemistry* **66**: 2643–2658.
- Franke, R., and Schreiber, L.** (2007). Suberin--a biopolyester forming apoplastic plant interfaces. *Curr Opin Plant Biol* **10**: 252–259.
- Fukada, H.** (1996). Xylogenesis: initiation, progression, and cell death. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**: 299–325.
- Funa, N., Ozawa, H., Hirata, A., and Horinouchi, S.** (2006). Phenolic lipid synthesis by type III polyketide synthases is essential for cyst formation in *Azotobacter vinelandii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 6356–6361.
- Goldberg, R.B., Beals, T.P., and Sanders, P.M.** (1993). Anther development: basic principles and practical applications. *Plant Cell* **5**: 1217–1229.
- Goldberg, R.B., Sanders, P.M., and Beals, T.P.** (1995). A novel cell-ablation strategy for studying plant development. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **350**: 5–17.
- Gou, J.Y., Yu, X.H., and Liu, C.J.** (2009). A hydroxycinnamoyltransferase responsible for synthesizing suberin aromatics in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 18855–18860.
- Graca, J., and Santos, S.** (2007). Suberin: a biopolyester of plants' skin. *Macromol Biosci* **7**: 128–135.
- Graca, J., Schreiber, L., Rodrigues, J., and Pereira, H.** (2002). Glycerol and glyceryl esters of omega-hydroxyacids in cutins. *Phytochemistry* **61**: 205–215.
- Hunt, G.M., and Baker, E.A.** (1980). Phenolic constituents of tomato fruit cuticles. *Phytochemistry* **19**: 1415–1419.
- Grienenberger, E. et al.** (2010). Analysis of TETRAKETIDE alpha-PYRONE REDUCTASE function in *Arabidopsis thaliana* reveals a previously unknown, but conserved, biochemical pathway in sporopollenin monomer biosynthesis. *Plant Cell* **22**: 4067–4083.
- Grienenberger, E. et al.** (2009). A BAHD acyltransferase is expressed in the tapetum of *Arabidopsis* anthers and is involved in the synthesis of hydroxycinnamoyl spermidines. *Plant J* **58**: 246–259.

BIBLIOGRAPHIE

- Guilford, W.J., Schneider, D.M., Labovitz, J., and Opella, S.J.** (1988). High Resolution Solid State C NMR Spectroscopy of Sporopollenins from Different Plant Taxa. *Plant Physiol* **86**: 134–136.
- Hahlbrock, K., and Scheel, D.** (1989). Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **40**: 347–369.
- Hamad, S.A., Dyab, A.F.K., Stoyanov, S.D., and Paunov, V.N.** (2011). Encapsulation of living cells into sporopollenin microcapsules. *J. Mater. Chem.* **21**: 18018–18023.
- Heo, J.B., and Sung, S.** (2011). Vernalization-mediated epigenetic silencing by a long intronic noncoding RNA. *Science* **331**: 76–79.
- Herrmann, K.M.** (1995). The Shikimate Pathway: Early Steps in the Biosynthesis of Aromatic Compounds. *Plant Cell* **7**: 907–919.
- Hertweck, C.** (2009). The biosynthetic logic of polyketide diversity. *Angew Chem Int Ed Engl* **48**: 4688–4716.
- Heslop-Harrison, J.** (1963). Ultrastructural aspects of differentiation in sporogenous tissue. *Symp Soc Exp Biol* **17**: 315–340.
- Higginson, T., Li, S.F., and Parish, R.W.** (2003). AtMYB103 regulates tapetum and trichome development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **35**: 177–192.
- Hoffmann-Benning, S., and Kende, H.** (1994). Cuticle Biosynthesis in Rapidly Growing Internodes of Deepwater Rice. *Plant Physiol* **104**: 719–723.
- Hord, C.L., Chen, C., Deyoung, B.J., Clark, S.E., and Ma, H.** (2006). The BAM1/BAM2 receptor-like kinases are important regulators of *Arabidopsis* early anther development. *Plant Cell* **18**: 1667–1680.
- Hrazdina, G., and Wagner, G.J.** (1985). Metabolic pathways as enzyme complexes: evidence for the synthesis of phenylpropanoids and flavonoids on membrane associated enzyme complexes. *Arch Biochem Biophys* **237**: 88–100.
- Hsieh, K., and Huang, A.H.** (2005). Lipid-rich tapetosomes in *Brassica* tapetum are composed of oleosin-coated oil droplets and vesicles, both assembled in and then detached from the endoplasmic reticulum. *Plant J* **43**: 889–899.
- Hsieh, K., and Huang, A.H.** (2007). Tapetosomes in *Brassica* tapetum accumulate endoplasmic reticulum-derived flavonoids and alkanes for delivery to the pollen surface. *Plant Cell* **19**: 582–596.
- Hsieh, K., and Huang, A.H.** (2004). Endoplasmic reticulum, oleosins, and oils in seeds and tapetum cells. *Plant Physiol* **136**: 3427–3434.

BIBLIOGRAPHIE

- Huang, M.D., Wei, F.J., Wu, C.C., Hsing, Y.I., and Huang, A.H.** (2009). Analyses of advanced rice anther transcriptomes reveal global tapetum secretory functions and potential proteins for lipid exine formation. *Plant Physiol* **149**: 694–707.
- Huysmans, S.** (1998). Orbicules in Angiosperms: Morphology, function, distribution, and Relation with Tapetum Types. *The botanical review* **64**: 240–272.
- Ishiguro, S. et al.** (2010). The Arabidopsis FLAKY POLLEN1 gene encodes a 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase required for development of tapetum-specific organelles and fertility of pollen grains. *Plant Cell Physiol* **51**: 896–911.
- Ito, T. et al.** (2007). Arabidopsis MALE STERILITY1 encodes a PHD-type transcription factor and regulates pollen and tapetum development. *Plant Cell* **19**: 3549–3562.
- Ito, T., and Shinozaki, K.** (2002). The MALE STERILITY1 gene of Arabidopsis, encoding a nuclear protein with a PHD-finger motif, is expressed in tapetal cells and is required for pollen maturation. *Plant Cell Physiol* **43**: 1285–1292.
- MA, J., PJ, R., and EN, A.** (1994). involvement of cork cells in the secretion of epicuticular wax filaments on sorghum bicolor (L) Moench. *Int. J. Plant. Sci* **155**: 506–518.
- Jorgensen, K. et al.** (2005). Metabolon formation and metabolic channeling in the biosynthesis of plant natural products. *Curr Opin Plant Biol* **8**: 280–291.
- Jung, K.H. et al.** (2006). Wax-deficient anther1 is involved in cuticle and wax production in rice anther walls and is required for pollen development. *Plant Cell* **18**: 3015–3032.
- Kim, S.S. et al.** (2010). LAP6/POLYKETIDE SYNTHASE A and LAP5/POLYKETIDE SYNTHASE B encode hydroxyalkyl alpha-pyrone synthases required for pollen development and sporopollenin biosynthesis in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* **22**: 4045–4066.
- Kögel-Knabner, I., Ziegler, F., M., R., and Zech, W.** (1989). Distribution and decomposition pattern of cutin and suberin in forest soils. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* **152**: 409–413.
- Koltunow, A.M., Truettner, J., Cox, K.H., Wallroth, M., and Goldberg, R.B.** (1990). Different Temporal and Spatial Gene Expression Patterns Occur during Anther Development. *Plant Cell* **2**: 1201–1224.
- Krizek, B.A.** (2011). Auxin regulation of Arabidopsis flower development involves members of the AINTEGUMENTA-LIKE/PLETHORA (AIL/PLT) family. *J Exp Bot* **62**: 3311–3319.
- Kroken, S.B., Graham, L.E., and Cook, M.E.** (1996). Occurrence and evolutionary significance of resistant cell walls in charophytes and bryophytes. *American Journal of Botany* **124**: 1241–1254.

BIBLIOGRAPHIE

- Kurdyukov, S. et al.** (2006). Genetic and biochemical evidence for involvement of HOTHEAD in the biosynthesis of long-chain alpha-,omega-dicarboxylic fatty acids and formation of extracellular matrix. *Planta* **224**: 315–329.
- Lanot, A. et al.** (2006). The glucosyltransferase UGT72E2 is responsible for monolignol 4-O-glucoside production in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **48**: 286–295.
- Leinhos, V., Udagama-Randeniya, P.V., and Savidge, R.A.** (1994). Purification of an acidic coniferin-hydrolysing beta-glucosidase from developing xylem of *Pinus banksiana*. *Phytochemistry* **37**: 311–315.
- Levine, T.** (2004). Short-range intracellular trafficking of small molecules across endoplasmic reticulum junctions. *Trends Cell Biol* **14**: 483–490.
- Li, H. et al.** (2010). Cytochrome P450 family member CYP704B2 catalyzes the {omega}-hydroxylation of fatty acids and is required for anther cutin biosynthesis and pollen exine formation in rice. *Plant Cell* **22**: 173–190.
- Li, N. et al.** (2006). The rice tapetum degeneration retardation gene is required for tapetum degradation and anther development. *Plant Cell* **18**: 2999–3014.
- Lim, E.K., Jackson, R.G., and Bowles, D.J.** (2005). Identification and characterisation of *Arabidopsis* glycosyltransferases capable of glucosylating coniferyl aldehyde and sinapyl aldehyde. *FEBS Lett* **579**: 2802–2806.
- Lim, E.K. et al.** (2001). Identification of glucosyltransferase genes involved in sinapate metabolism and lignin synthesis in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **276**: 4344–4349.
- Lotfy, S., Javelle, F., and Negrel, J.** (1995). Distribution of hydroxycinnamoyl-CoA : omega-hydroxypalmitic acid O-hydroxycinnamoyltransferases in higher plants. *phytochemistry* **40**: 389–391.
- Luo, S., Li, Y., Chen, S., Zhang, D., and Renner, S.S.** (2011). Gelechiidae moths are capable of chemically dissolving the pollen of their host plants: first documented sporopollenin breakdown by an animal. *PLoS One* **6**: e19219.
- Ma, H.** (2005). Molecular genetic analyses of microsporogenesis and microgametogenesis in flowering plants. *Annu Rev Plant Biol* **56**: 393–434.
- Maack, A.** (2007). Soluble composition containing sporopollenin and the use thereof. US patent No. 7,182,965 B2
- Mackenzie, A., Heslop-Harrison, J., and Dickinson, H.G.** (1967). Elimination of ribosomes during meiotic prophase. *Nature* **215**: 997–999.
- Matas, A., and Heredia, A.** (1999). Molecular Dynamics Modellization and Simulation of Water Diffusion through Plant Cutin. *Z. Naturforsch.* **54**: 896–902.

BIBLIOGRAPHIE

- Matsuda, N., Tsuchiya, T., Kishitani, S., Tanaka, Y., and Toriyama, K.** (1996). Partial male sterility in transgenic tobacco carrying antisense and sense PAL cDNA under the control of a tapetum-specific promoter. *Plant cell physiol* **37**: 215–222.
- Mayfield, J.A., Fiebig, A., Johnstone, S.E., and Preuss, D.** (2001). Gene families from the *Arabidopsis thaliana* pollen coat proteome. *Science* **292**: 2482–2485.
- Mayfield, J.A., and Preuss, D.** (2000). Rapid initiation of *Arabidopsis* pollination requires the oleosin-domain protein GRP17. *Nat Cell Biol* **2**: 128–130.
- McCormick, S.** (1993). Male Gametophyte Development. *Plant Cell* **5**: 1265–1275.
- McNeil, K.J., and Smith, A.G.** (2010). A glycine-rich protein that facilitates exine formation during tomato pollen development. *Planta* **231**: 793–808.
- Mizuno, S. et al.** (2007). Receptor-like protein kinase 2 (RPK 2) is a novel factor controlling anther development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **50**: 751–766.
- Mizuuchi, Y., Shimokawa, Y., Wanibuchi, K., Noguchi, H., and Abe, I.** (2008). Structure function analysis of novel type III polyketide synthases from *Arabidopsis thaliana*. *Biol Pharm Bull* **31**: 2205–2210.
- Mo, Y., Nagel, C., and Taylor, L.P.** (1992). Biochemical complementation of chalcone synthase mutants defines a role for flavonols in functional pollen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 7213–7217.
- Molina, I., Li-Beisson, Y., Beisson, F., Ohlrogge, J.B., and Pollard, M.** (2009). Identification of an *Arabidopsis* feruloyl-coenzyme A transferase required for suberin synthesis. *Plant Physiol* **151**: 1317–1328.
- Monties, B.** (1989). Lignins. *Methods in plant biochemistry* **1**:113-157.
- Morant, M. et al.** (2007). CYP703 is an ancient cytochrome P450 in land plants catalyzing in-chain hydroxylation of lauric acid to provide building blocks for sporopollenin synthesis in pollen. *Plant Cell* **19**: 1473–1487.
- Murgia, M., Charzynska, M., Rougier, M., and Cresti, M.** (1991). Secretory tapetum of *Brassica oleracea* L.: polarity and ultrastructural features. *Sex Plant Reprod* **4**: 28–35.
- Murphy, D.J., and Ross, J.H.** (1998). Biosynthesis, targeting and processing of oleosin-like proteins, which are major pollen coat components in *Brassica napus*. *Plant J* **13**: 1–16.
- Nakashima, J., Takabe, K., Fujita, M., and Saiki, H.** (1997). Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase activity causes the depression of lignin accumulation of secondary wall thickening in isolated *Zinnia* mesophyll cells. *Protoplasma* **196**: 99–107.

BIBLIOGRAPHIE

- Nichols, K.K., Ham, B.M., Nichols, J.J., Ziegler, C., and Green-Church, K.B.** (2007). Identification of fatty acids and fatty acid amides in human meibomian gland secretions. *Investigative ophthalmology & visual science* **48**: 34–39.
- Onnerud, H., Zhang, L., Gellerstedt, G., and Henriksson, G.** (2002). Polymerization of monolignols by redox shuttle-mediated enzymatic oxidation: a new model in lignin biosynthesis I. *Plant Cell* **14**: 1953–1962.
- Owen, H.A., and Makaroff, C.A.** (1995). Ultrastructure of microsporogenesis and microgametogenesis in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. ecotype Wassilewskija (Bassicaceae). *Protoplasma* **185**: 7–21.
- Pacini, E., Franchi, G.G., and Hesse, M.** (1985). The tapetum: Its form, function, and possible phylogeny in Embryophyta. *Plant Systematics and Evolution* **149**: 155–185.
- Pacini, E., and Hesse, M.** (2005). Pollenkitt-its composition, forms and functions. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* **200**: 399–415.
- Paxson-Sowers** (1997). A comparative ultrastructural analysis of exine pattern development in wild-type *Arabidopsis* and a mutant defective in pattern formation. *Protoplasma* **198**: 53–65.
- Paxson-Sowers, D.M., Dodrill, C.H., Owen, H.A., and Makaroff, C.A.** (2001). DEX1, a novel plant protein, is required for exine pattern formation during pollen development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **127**: 1739–1749.
- Peeters, J.W., van Leeuwen, O., Palmans, A.R.A., and Meijer, E.W.** (2005). Lipase-catalyzed ring-opening polymerizations of 4-substituted ϵ -caprolactones: mechanistic considerations. *Macromolecules* **38**: 5587–5592.
- Phan, H.A., Iacuone, S., Li, S.F., and Parish, R.W.** (2011). The MYB80 transcription factor is required for pollen development and the regulation of tapetal programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **23**: 2209–2224.
- Piffanelli, P., Ross, J.H.E., and Murphy, D.J.** (1998). Biogenesis and function of the lipidic structures of pollen grains. *Sex Plant Reprod* **11**: 65–80.
- Piffanelli, P., Ross, J.H., and Murphy, D.J.** (1997). Intra- and extracellular lipid composition and associated gene expression patterns during pollen development in *Brassica napus*. *Plant J* **11**: 549–562.
- Pighin, J.A. et al.** (2004). Plant cuticular lipid export requires an ABC transporter. *Science* **306**: 702–704.

BIBLIOGRAPHIE

- Platt, K.A., Huang, A.H., and Thomson, W.W.** (1998). Ultrastructural study of lipid accumulation in tapetal cells of *Brassica napus* L cv. Westar during microsporogenesis. *Int. J. Plant Sci.* **159**: 724–737.
- Pollard, M., Beisson, F., Li, Y., and Ohlrogge, J.B.** (2008). Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin. *Trends Plant Sci* **13**: 236–246.
- Preuss, D., Lemieux, B., Yen, G., and Davis, R.W.** (1993). A conditional sterile mutation eliminates surface components from *Arabidopsis* pollen and disrupts cell signaling during fertilization. *Genes Dev* **7**: 974–985.
- Pruitt, R.E., Vielle-Calzada, J.P., Ploense, S.E., Grossniklaus, U., and Lolle, S.J.** (2000). FIDDLEHEAD, a gene required to suppress epidermal cell interactions in *Arabidopsis*, encodes a putative lipid biosynthetic enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 1311–1316.
- Quilichini, T.D., Friedmann, M.C., Samuels, A.L., and Douglas, C.J.** (2010). ATP-binding cassette transporter G26 is required for male fertility and pollen exine formation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **154**: 678–690.
- Radakovits, R., Jinkerson, R.E., Darzins, A., and Posewitz, M.C.** (2010). Genetic engineering of algae for enhanced biofuel production. *Eukaryot Cell* **9**: 486–501.
- Ranathunge, K., Schreiber, L., and Franke, R.** (2011). Suberin research in the genomics era--new interest for an old polymer. *Plant Sci* **180**: 399–413.
- Rasmussen, S., and Dixon, R.A.** (1999). Transgene-mediated and elicitor-induced perturbation of metabolic channeling at the entry point into the phenylpropanoid pathway. *Plant Cell* **11**: 1537–1552.
- Ro, D.K., Mah, N., Ellis, B.E., and Douglas, C.J.** (2001). Functional characterization and subcellular localization of poplar (*Populus trichocarpa* x *Populus deltoides*) cinnamate 4-hydroxylase. *Plant Physiol* **126**: 317–329.
- Robinson, D.G., Herranz, M.-C., Bubeck, J., Pepperkok, R., and Ritzenthaler, C.** (2007). Membrane dynamics in the early secretory pathway. *Crit Rev Plant Sci* **26**: 199–225.
- Ross, J.H., and Murphy, D.J.** (1996). Characterization of anther-expressed genes encoding a major class of extracellular oleosin-like proteins in the pollen coat of Brassicaceae. *Plant J* **9**: 625–637.
- Rozema, J., Blokker, P., Mayoral Fuertes, M.A., and Broekman, R.** (2009). UV-B absorbing compounds in present-day and fossil pollen, spores, cuticles, seed coats and wood: evaluation of a proxy for solar UV radiation. *Photochem Photobiol Sci* **8**: 1233–1243.

BIBLIOGRAPHIE

- Rozema, J. et al.** (2001). UV-B absorbance and UV-B absorbing compounds (para-coumaric acid) in pollen and sporopollenin: the perspective to track historic UV-B levels. *J Photochem Photobiol B* **62**: 108–117.
- Ruddell, C.J., Allen, G.J., and Evans..., D.R.** (2006). Agglutination Assay. US Patent No. 2008/0248504 A1.
- Sambrook, J., and Russel, D.W.** (2001). *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Samuels, L., Kunst, L., and Jetter, R.** (2008). Sealing plant surfaces: cuticular wax formation by epidermal cells. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 683–707.
- Sanders, P.M. et al.** (1999). Anther developmental defects in *Arabidopsis thaliana* male-sterile mutants. *Sex. Plant Reprod.* **11**: 297–322.
- Saslowsky, D., and Winkel-Shirley, B.** (2001). Localization of flavonoid enzymes in *Arabidopsis* roots. *Plant J* **27**: 37–48.
- Schijlen, E.G.W.M., Ric de Vos, C.H., van Tunen, A.J., and Bovy, A.G.** (2004). Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. *Phytochemistry* **65**: 2631–2648.
- Schreiber, L.** (2010). Transport barriers made of cutin, suberin and associated waxes. *Trends Plant Sci* **15**: 546–553.
- Scott, R.J., Spielman, M., and Dickinson, H.G.** (2004). Stamen structure and function. *Plant Cell* **16**: S46–S60.
- Shi, J. et al.** (2011). Defective pollen wall is required for anther and microspore development in rice and encodes a fatty acyl carrier protein reductase. *Plant Cell* **23**: 2225–2246.
- Shirley, B.W.** (1996). Flavonoid biosynthesis: 'new' functions for an 'old' pathway. *Trends in plant science* **1**: 377–382.
- Shirley, B.W. et al.** (1995). Analysis of *Arabidopsis* mutants deficient in flavonoid biosynthesis. *Plant J* **8**: 659–671.
- Sorensen, A.M. et al.** (2003). The *Arabidopsis* ABORTED MICROSPORES (AMS) gene encodes a MYC class transcription factor. *Plant J* **33**: 413–423.
- Southworth, D.** (1974). Solubility of pollen exines. *American Journal of Botany* **61**: 36–44.
- Stahelin, L.A.** (1997). The plant ER: a dynamic organelle composed of a large number of discrete functional domains. *Plant J* **11**: 1151–1165.
- Staiger, D., Kappeler, S., Müller, M., and Apell, K.** (1994). The proteins encoded by two tapetum-specific transcripts, Satap35 and Satap44, from *Sinapis alba* L. are localized in the exine cell wall layer of developing microspores. *Planta* **192**: 221–231.

BIBLIOGRAPHIE

- Suen, D.F., Wu, S.S., Chang, H.C., Dhugga, K.S., and Huang, A.H.** (2003). Cell wall reactive proteins in the coat and wall of maize pollen: potential role in pollen tube growth on the stigma and through the style. *J Biol Chem* **278**: 43672–43681.
- Sun, Y., Hays, N.M., Periasamy, A., Davidson, M.W., and Day, R.N.** (2012). Monitoring protein interactions in living cells with fluorescence lifetime imaging microscopy. *Methods Enzymol* **504**: 371–391.
- Sutthasupa, S., Shiotsuki, M., and Sanda, F.** (2010). Recent advances in ring-opening metathesis polymerization, and application to synthesis of functional materials. *Polymer journal* **42**: 905–915.
- Suzuki, T., Masaoka, K., Nishi, M., Nakamura, K., and Ishiguro, S.** (2008). Identification of kaonashi mutants showing abnormal pollen exine structure in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **49**: 1465–1477.
- Tang, L.K., Chu, H., Yip, W.K., Yeung, E.C., and Lo, C.** (2009). An anther-specific dihydroflavonol 4-reductase-like gene (DRL1) is essential for male fertility in *Arabidopsis*. *New Phytol* **181**: 576–587.
- Terashima, N., Fukushima, K., Sano, Y., and Takabe, K.** (1988). Heterogeneity in formation of lignin. Visualization of lignification process in differentiating xylem of pine by microautoradiography. *Holzforschung* **42**: 347–350.
- Theissen, G., and Saedler, H.** (2001). Plant biology. Floral quartets. *Nature* **409**: 469–471.
- Toufighi, K., Brady, S.M., Austin, R., Ly, E., and Provar, N.J.** (2005). The Botany Array Resource: e-Northern, Expression Angling, and promoter analyses. *Plant J* **43**: 153–163.
- Tsuchiya, T., Toriyama, K., Yoshikawa, M., Ejiri, S., and Hinata, K.** (1995). Tapetum-specific expression of the gene for an endo-beta-1,3-glucanase causes male sterility in transgenic tobacco. *Plant Cell Physiol* **36**: 487–494.
- Van der Meer, I.M., Stam, M.E., van Tunen, A.J., Mol, J.N., and Stuitje, A.R.** (1992). Antisense inhibition of flavonoid biosynthesis in petunia anthers results in male sterility. *Plant Cell* **4**: 253–262.
- Vogt, T.** (2010). Phenylpropanoid biosynthesis. *Mol Plant* **3**: 2–20.
- Waduwara, C.I., Walcott, S.E., and Peterson, C.A.** (2008). Suberin lamellae of the onion root endodermis: their pattern of development and continuity. *Canadian Journal of Botany* **86**: 623–632.
- Wang, A., Xia, Q., Xie, W., Datla, R., and Selvaraj, G.** (2003). The classical Ubisch bodies carry a sporophytically produced structural protein (RAFTIN) that is essential for pollen development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 14487–14492.

BIBLIOGRAPHIE

- Watson, J.S. et al.** (2007). Rapid determination of spore chemistry using thermochemolysis gas chromatography-mass spectrometry and micro-Fourier transform infrared spectroscopy. *Photochem Photobiol Sci* **6**: 689–694.
- Wenda, N., Woehlecke, H., Detloff, T., and Lerche, D.** (2012). Design of Particulate Systems by Variation of the Characteristics of Biogenic Particles. *Chemie Ingenieur Technik* **84**: 309-314.
- Wilmesmeier, S., and Wiermann, R.** (1995). Influence of EPTC (S-Ethyl-Dipropyl-Thiocarbamate) on the Composition of Surface Waxes and Sporopollenin Structure in *Zea mays*. *Journal of Plant Physiology* **146**: 22–28.
- Wilson, Z.A., Morroll, S.M., Dawson, J., Swarup, R., and Tighe, P.J.** (2001). The *Arabidopsis* MALE STERILITY1 (MS1) gene is a transcriptional regulator of male gametogenesis, with homology to the PHD-finger family of transcription factors. *Plant J* **28**: 27–39.
- Wilson, Z.A., and Zhang, D.B.** (2009). From *Arabidopsis* to rice: pathways in pollen development. *J Exp Bot* **60**: 1479–1492.
- Winkel-Shirley, B.** (2001). Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol* **126**: 485–493.
- Winkel, B.S.** (2004). Metabolic channeling in plants. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 85–107.
- Wu, S.S. et al.** (1997). Isolation and characterization of neutral-lipid-containing organelles and globuli-filled plastids from *Brassica napus* tapetum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 12711–12716.
- Wu, S.S., Moreau, R.A., Whitaker, B.D., and Huang, A.H.** (1999). Steryl esters in the elaioplasts of the tapetum in developing *Brassica* anthers and their recovery on the pollen surface. *Lipids* **34**: 517–523.
- Wu, X. et al.** (2007). Biochemical characterization of TASSELSEED 2, an essential plant short-chain dehydrogenase/reductase with broad spectrum activities. *FEBS J* **274**: 1172–1182.
- Xie, Q., Sanz-Burgos, A.P., Hannon, G.J., and Gutierrez, C.** (1996). Plant cells contain a novel member of the retinoblastoma family of growth regulatory proteins. *EMBO J* **15**: 4900–4908.
- Yang, C., Vizcay-Barrena, G., Conner, K., and Wilson, Z.A.** (2007). MALE STERILITY1 is required for tapetal development and pollen wall biosynthesis. *Plant Cell* **19**: 3530–3548.
- Yang, W. et al.** (2010). A distinct type of glycerol-3-phosphate acyltransferase with sn-2 preference and phosphatase activity producing 2-monoacylglycerol. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 12040–12045.

BIBLIOGRAPHIE

- Yeats, T.H. et al.** (2012). The identification of cutin synthase: formation of the plant polyester cutin. *Nat Chem Biol* **8**: 609-611
- Yi, B. et al.** (2010). Two duplicate CYP704B1-homologous genes BnMs1 and BnMs2 are required for pollen exine formation and tapetal development in *Brassica napus*. *Plant J* **63**: 925–938.
- Zhang, D. et al.** (2010). OsC6, encoding a lipid transfer protein, is required for postmeiotic anther development in rice. *Plant Physiol* **154**: 149–162.
- Zhang, W. et al.** (2006). Regulation of *Arabidopsis* tapetum development and function by DYSFUNCTIONAL TAPETUM1 (DYT1) encoding a putative bHLH transcription factor. *Development* **133**: 3085–3095.
- Zhang, Z.B. et al.** (2007). Transcription factor AtMYB103 is required for anther development by regulating tapetum development, callose dissolution and exine formation in *Arabidopsis*. *Plant J* **52**: 528–538.
- Zhao, D.Z., Wang, G.F., Speal, B., and Ma, H.** (2002). The excess microsporocytes1 gene encodes a putative leucine-rich repeat receptor protein kinase that controls somatic and reproductive cell fates in the *Arabidopsis* anther. *Genes Dev* **16**: 2021–2031.
- Zheng, Z. et al.** (2003). *Arabidopsis* AtGPAT1, a member of the membrane-bound glycerol-3-phosphate acyltransferase gene family, is essential for tapetum differentiation and male fertility. *Plant Cell* **15**: 1872–1887.
- Zinkl, G.M., Zwiebel, B.I., Grier, D.G., and Preuss, D.** (1999). Pollen-stigma adhesion in *Arabidopsis*: a species-specific interaction mediated by lipophilic molecules in the pollen exine. *Development* **126**: 5431–5440.

Caractérisation fonctionnelle de gènes impliqués dans le développement du pollen chez *Arabidopsis thaliana*

Résumé

Le polymère de sporopollénine est un constituant majeur de la paroi du grain de pollen d'une exceptionnelle résistance mécanique et chimique. Au cours de ma thèse, j'ai caractérisé deux Polykétide Synthases (PKS-A et PKS-B) et deux Tétrakétide α -Pyrone Réductases (TKPR1 et TKPR2) d'*Arabidopsis thaliana* intervenant dans la formation de cette paroi pollinique.

Nous avons montré que, *in vitro*, les deux PKS catalysent la condensation de tri et tétrakétide α -pyrones et que la fonction cétone du tétrakétide pouvait être réduite par TKPR1 et TKPR2 en alcool secondaire formant des composés hydroxylés, précurseurs du polymère de sporopollénine.

Dans les cellules du tapétum, cette synthèse se déroule en quelques heures seulement. En démontrant que certaines enzymes se trouvent à la surface du réticulum endoplasmique et que ces protéines semblent former un métabolon conservé au sein des angiospermes, j'ai pu expliquer un tel flux métabolique.

Paroi, Pollen, Exine, Polykétide, Métabolon, Polymère, Réseau, Métabolique

Abstract

The sporopollenin polymer is the major constituent of the outer pollen wall, and confers a high degree of resistance to mechanical and chemical stresses. We characterised two Polyketide Synthases (PKSA and PKSB) and two Tetraketide α -pyrone Reductases (TKPR1 and TKPR2) involved in pollen wall synthesis.

In vitro, we showed that the two PKS catalyse the condensation of tri and tetraketides α -pyrones and that the cetone function of the lateral chain can be reduced by TKPR1 and TKPR2 to a secondary alcohol forming hydroxylated compounds involved in the polymerization of sporopollenin.

In tapetum cells, the synthesis of sporopollenin monomers is achieved in a few hours. To explain the underlying metabolic rate, I studied the cellular organization of the metabolic pathway and demonstrated that some proteins localize the endoplasmic reticulum and may form a metabolon conserved from mosses to higher plants.

Wall, Pollen, Exine, Polyketide, Métabolon, Polymer, Network, Metabolic