THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR
DE MONTPELLIER SUPAGRO

En Biologie, Interactions, Diversité Adaptative des Plantes (BIDAP)

École doctorale GAIA – Biodiversité, Agriculture, Alimentation, Environnement, Terre, Eau

Unité de recherche B&PMP- Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes

Homéostasie des protons dans la baie de raisin en lien avec le changement climatique

Présentée par Hortense Moreau
Le 14 Décembre 2021

Sous la direction de Nadine Paris

Devant le jury composé de

Herman Höfte, Directeur de Recherche, INRAE Versailles	Rapporteur
Stéphanie Robert, Professeure, Université suédoise des sciences agricoles	Rapporteuse
Alexis De Angeli, Directeur de Recherche, CNRS Montpellier	Examinateur
Jean-Luc Verdeil, Directeur de Recherche, Cirad Montpellier	Examinateur
Maité Vicré-Gibouain, Maître de Conférence, Université de Rouen	Examinatrice
Nadine Paris, Chargée de Recherche, CNRS Montpellier	Directrice de thèse

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

Montpellier SupAgro

Remerciements

C’est avec beaucoup d’émotions que j’écris ces quelques lignes pour remercier les personnes qui ont contribuées à mon travail de thèse. Ces mots ne pourront exprimer à sa juste valeur l’immense gratitude que je ressens à l’égard de tous ceux qui ont été là pour moi ces trois dernières années. Néanmoins, ils constitueront une trace écrite du travail collectif qui m’a entouré dans mon projet de thèse.

Ce travail n’aurait pu être mené à bien sans la région Occitanie et le département BAP de l’INRAE que je remercie d’avoir financé mon projet de thèse.

Merci aux membres de mon comité de thèse, Alexandre Martinière, Thierry Simonneau, Samantha Vernhettes et Isabelle Gaillard pour vos conseils bienveillants qui m’ont orienté et poussé à donner le meilleur de moi. Plus qu’un rendez-vous annuel, vous avez tous contribué significativement à mon projet de thèse. Merci Alex pour tes conseils, ton enthousiasme et toutes les discussions passionnantes. Merci Thierry pour les pieds de Grenache qui m’ont permis d’obtenir enfin des données sur le raisin au cours de cette dernière année. Merci à Samantha pour les conseils, les discussions Skype et la collaboration qui est en cours. Merci Isabelle pour votre présence au quotidien.

Merci aux membres de mon jury de thèse, Herman Höfte, Stéphanie Robert, Alexis De Angeli, Maïté Vicré- Gibouin et Jean Luc Verdeil d’avoir accepté d’évaluer mon travail.

Merci Nadine de m’avoir donné l’opportunité de réaliser une thèse et de m’avoir accompagné et soutenu au cours de ces trois dernières années. A vos côtés, j’ai pu mesurer à quel point la recherche est un métier de passion. Merci de m’avoir laissé une place dans ce projet de recherche dans lequel vous vous êtes tant investie. Enfin et pas des moindres, merci de m’avoir laissé la main au confocal, de loin votre microscope préféré !

Merci à mon équipe KalipHruit pour l’accueil qu’elle m’a réservé et l’ambiance au quotidien. Merci Isa G., Isa.C et Sabine pour toutes les discussions constructives qui m’ont permis d’évoluer sur le plan scientifique. Merci à Jérémy, Morgan et Houssein pour la super ambiance dans le bureau, le quotidien à vos côtés est plus doux. Merci aussi à Tania, Muhammad et Anjara. Merci Marie-Elsie pour ton aide précieuse.

Merci à tous les membres de l’UMR B&PMP et en particulier à ceux qui se sont montrés disponible et prêts à m’aider chaque fois que j’en ai eu besoin. Je tiens à adresser un grand merci à la plateforme d’imagerie PHIV et en particulier à Carine qui m’a sauvé un nombre incalculable de fois, à Tou Cheu et à Alexandre. Je souhaite aussi remercier chaleureusement la cellule « moyens de cultures » qui s’est toujours montrée disponible et d’un énorme soutien pour m’aider en particulier avec la culture de la vigne. Merci Hugues, Thierry, José et Jeff ! Merci à Romain du Lepse pour ton aide et

tes conseils sur la vigne. Un grand merci à Jean Pierre de l'UMR EGFV pour tout le matériel végétal, le temps que tu as passé à me prodiguer tes précieux conseils. Sache que ta passion pour la culture de la vigne est contagieuse. Merci Victor et Mariam d'avoir accepté les vignes dans votre jardin pendant le 1er confinement et plus encore. Je vous en suis reconnaissante, vous m'avez aidé à ne pas renoncer et à tenter le tout pour le tout !

J'exprime ma gratitude aux enseignants chercheurs, Laurence, Loren, Liên, Bruno et Guilhem pour m'avoir accompagné, conseillé et soutenu pendant mes vacations. Merci de m'avoir donné l'opportunité d'enseigner et de participer à la transmission des connaissances, chose qui me tient tant à cœur.

Je souhaite remercier du fond du cœur David et Fatma pour m'avoir montré le meilleur de la recherche. Vous avez toujours cru en moi et vous m'avez donné envie de faire une thèse. Les stages que j'ai réalisés à vos côtés ont été déterminants dans mon parcours et je ne l'oublierai jamais.

Je remercie tout particulièrement mes copains du labo. Jérémy, Gabriella, Man Yuan et Thanyakorn pour votre accueil à mon arrivée. Marija, ma coloc préférée. Merci aussi à Benjamin, exilé bordelais comme moi. Et bien évidement, MERCI Loren, Morgan, Thibault, Alexis, Amélie et Lucille. Vous avez été mon rayon de soleil pendant ces derniers mois. Je serai éternellement nostalgique de nos parties de Uno le midi et de tous les bons moments que nous avons passés en dehors du labo. Vous allez beaucoup me manquer. Merci à Tam pour son soutien dans la dernière ligne droite. Merci à Marie ma binôme de fac pour tous les fous rires et les discussions autour de la thèse.

Merci au soutien sans faille de mes meilleures amies d'enfance Audrey et Camille. Votre amitié me porte depuis tant d'années. J'ai hâte de vous retrouver et de passer de bons moments avec Andréa et Matthieu. Merci à mes copains Montois Anne Sophie, PC, Vincent et Marie pour votre soutien et pour vous être toujours intéressés à ce que je faisais.

Je tiens à remercier ma famille : mes parents, mes trois adorables petites sœurs, Carmen et Camille pour l'amour que vous me portez. Sans vous, rien ne serait possible.

Merci Clément pour ton soutien inconditionnel, ton amour et ta patience. Merci pour tous les sacrifices faits, merci d'avoir accepté la distance pour que je réalise mon rêve de faire une thèse.

Enfin, merci à toutes les personnes que je n'ai pas citées et qui ont fait de ma thèse une expérience aussi enrichissante sur le plan humain que le plan scientifique.

Table des matières

Liste des figures et des tableaux (hors article) 1
Liste des abréviations 8
Avant-propos 10
Introduction 12
I. La croissance des cellules végétales 12
II. Description anatomique et physiologique des deux modèles étudiés 13
1. La baie de raisin 13
2. La racine primaire d'Arabidopsis thaliana 17
III. L'espace apoplasmique : un environnement complexe et hétérogène 20
IV. Les mécanismes de l'élongation cellulaire 25
1. Déclenchement et mécanisme d'élongation cellulaire 25
2. Contrôle de l'élongation cellulaire 29
V. Les outils fluorescents permettant de réaliser des mesures de pH dans l'apoplasme 31
1. Les microélectrodes à H^+: 31
2. Les outils fluorescents 32
Plan des chapitres composant ce manuscrit 33
Matériel et méthode 35
I. Matériel végétal et conditions de culture 35
1. Arabidopsis thaliana 35
2. Tabac (Nicotiana tabacum) 36
3. La vigne (Vitis vinifera) 36
II. Transformation du matériel végétal et caractérisation 36
1. Transformation stable d'Arabidopsis thaliana 36
2. Transformation transitoire de tabac 36
3. Transformation transitoire de baies de raisin 37
III. Biologie moléculaire 38
1. Souche et origine du matériel utilisé 38
2. Clonage moléculaire 39
IV. Caractérisation du matériel obtenu 40
1. Génotypage des mutants et surexpresseurs d'Arabidopsis 40
2. Phénotypage des lignées Arabidopsis 40
3. SDS-Page et analyse des profils protéiques 40
V. Calibration et mesures de pH 40

1. Production de senseur de pH en bactéries 40
2. Calibration pour mesure de pH 41
3. Obtention des gammes de calibration 41
VI. Imagerie 42
1. Sondes fluorescentes et drogues utilisées 42
2. Microscopes et réglages 42
3. Imagerie confocale 44
4. Imagerie ratiométrique 45
VII. Analyse des images et données et statistiques 40
1. Mesures de pH et analyses des images 46
2. Obtention de données de croissance 46
Chapitre 1: pH biosensing in the plant apoplast—a focus on root cell elongation
Chapitre 2 : Développement et caractérisation de nouveaux senseurs de pH génétiquement encodés adaptés à un environnement acide 47
Introduction 47
Résultats : Genetically encoded fluorescent sensors adapted to acidic pH highlight subdomains within the apoplast 49
Discussion et perspectives 98
1. Mesures de pH dans un environnement acide 98
2. Hétérogénéité de pH dans l'espace apoplasmique 101
A) Dans les cellules d'épiderme de tabac 101
B) Dans la racine primaire d'Arabidopsis 102
3. Couverture de l'espace apoplasmique par les PM-Apo et Apo Acidines 103
4. Obtention de données de pH à l'échelle d'une seule cellule 103
5. Potentiel des Acidines 109
Chapitre 3 : Développement et caractérisation de nouveaux senseurs pour explorer le pH de la paroi 112
Introduction : 112
Résultats : 113
I. Fusion avec la protéine pariétale LuPME1 113
1. Origine et description de la protéine LuPME1 113
2. Constructions des fusions LuPME1-pHluorine 114
3. Expression des fusions LuPME1 en épiderme de tabac 115
4. Activité de la fusion LuPME1-pHluorine 118
II. Fusion AT5G11420-pHluorine 119
1. Présentation 119

2. Construction de la fusion AT5G11420-pHluorine : 120
3. Localisation de la fusion AT5G11420-pHluorine : 121
4. Conclusions sur la localisation des fusions pariétales exprimées en épiderme de tabac 123
III. Données de ratio de fluorescence obtenues par les fusions pariétales en tabac 123
IV. Expression des fusions pariétales basées sur le pHluorine en Arabidopsis 125
1. Synthèse des lignées générées 125
2. Phénotypage des lignées d'Arabidopsis exprimant les fusions pariétales 126
3. Marquage fluorescent des plantules d'Arabidopsis exprimant stablement les fusions pariétales 127
V. Calibration *in vivo* dans la racine d'Arabidopsis pour l'obtention d'informations de pH 141
VI. Outils pour explorer le pH de la paroi en relation avec la méthylation des pectines 148
1. Caractérisation des lignées présentant un degré de méthylation des pectines altéré 148
2. Inhibition chimique de l'activité des PMEs 152
3. Variations de pH dans le poil racinaire 153
Conclusion et discussion 154
1. Localisation des fusions pariétales 155
2. Mesure du pH dans la paroi avec les fusions pariétales pHluorine 156
3. Activité des protéines pariétales pour générer les senseurs de pH pariétaux 157
4. Lien entre degré de méthylestérification des pectines et pH 158
Chapitre 4 : Cartographie des pH dans la baie de raisin 160
Introduction : 166
Résultats 166
I. Exploration de l'espace apoplasmique des cellules de la pulpe de baie de raisin 166
1.Expression de la fusion PM-Apo + 1,5 pHluorine pour réaliser des mesures de pH apoplasmique 166
2. Marquage de l'espace apoplasmique avec de l'oregon green seul ou couplé au dextran 167
3. Marquage des parois pectiniques avec l'iodure de propidium et le COS^{488} 170
II. Mesure du pH vacuolaire : 172
1. Expression de la fusion AtAleu-Acidine2 dans la vacuole 172
2. Marquage de la vacuole avec des sondes fluorescentes Oregon Green 488, le BCECF-AM et le FSTS 176
A) Marquage de la vacuole avec de l'Oregon Green 488 176
B) Marquage de la vacuole avec du BCECF-AM 177
C) Marquage de la vacuole et mesures de pH avec le FSTS 179

Discussion : 184
1. Etude du pH apoplasmique 185
2. Etude du pH vacuolaire au cours du développement 187
Conclusion générale et perspectives 189
Annexes 197
Références bibliographiques 203

Listes des figures et des tableaux (hors article)

Matériel et méthodes

Figure 1 : Coupe longitudinale d'une baie de raisin. Les trois sites d'injection sont indiqués par une flèche rouge.

Tableau 1 : Détail des vecteurs utilisés.

Tableau 2 : Liste des souches de bactéries utilisées.

Tableau3 : Origine des différentes protéines utilisées.

Tableau4 : Liste des sondes fluorescentes utilisées.

Tableau 5 : Détail des filtres utilisés du macroscope Axiozoom V16.

Tableau 6 : Détail des filtres du microscope à épifluorescence observer 7 Zeiss.

Tableau 7 : Filtres utilisés au microscope confocal Leica Sp8.

Tableau 8 : Liste des filtres du microscope inversé à épifluorescence Zeiss Axiovert 200M.

Figure 2 : Système d'observation des plantules d'Arabidopsis au ratiométrique

Introduction

Figure I.1 : Coupe longitudinale d'une baie de raisin.

Figure I.2 : Schéma du développement de la baie de raisin.

Figure I.3 : Organisation de la racine primaire d'Arabidopsis.

Figure I.4 : Représentation schématique de l'espace apoplasmique.

Figure I.5 : Les PMEs (région pro en rouge et partie mature en vert) exercent leur activité de déméthylation selon différents modes.

Figure I.6 : L'élongation d'une cellule de racine – première étape : préparation à l'élongation.

Figure I.7 : L'élongation d'une cellule de racine - deuxième étape : le relâchement de la paroi et la turgescence permettent l'élongation de la cellule.

Figure I.8 : Régulation de l'activité de l'AHA2 par les peptides sécrétés RALFs et PSY1.

Chapitre 2 : Développement et caractérisation de nouveaux senseurs de pH génétiquement encodés adaptés à un environnement acide

Figure II.1 : Gamme de pH couverte par les senseurs de pH génétiquement encodés disponibles.

Figure II.2 : Gamme de pH couverte par les Acidines.

Figure II.3 : Gammes de calibration *in vivo* dans trois zones de la racine exprimant l'Apo-Acidine2 : zone de division (DZ), zone de transition (TZ) et zone d'élongation (EZ).

Figure II.4 : Observation au microscope confocal de cellules racinaires d'une plantule d'Arabidopsis de 5j exprimant la PM-Apo Acidine4.

Figure II.5: La croissance du poil racinaire s'accompagne de variations de pH.

Figure II.6 : Profil d'expression du gène *EXPANSINE 7* dans la racine.

Figure III.7 : Observation au microscope à épifluorescence des poils racinaires à différents stade de croissance d'une racine d'Arabidopsis de 5j exprimant pEXPA7::PM-Apo-Acidine4::TNOS.

Figure II.8 : Marquage de la PM-Apo-Acidine 4 dans un poil racinaire en élongation d'une racine d'Arabidopsis de 5j après excitation à 488 et 561nm.

Figure II.9 : Marquage de l'Apo Acidine 4 dans un poil racinaire en élongation d'une racine d'Arabidopsis de 5j après excitation à 488 et 561nm.

Figure II. 10 : Effet de RALF22 sur le pH de la zone de transition de plantes de 5j exprimant la PM-Apo-Acidine4.

Chapitre 3 : Développement et caractérisation de nouveaux senseurs pour explorer le pH de la paroi

Figure III.1: Séquence de la protéine LuPME1.

Figure III.2 : Observation au microscope confocal du marquage fluorescent de la fusion LuPME1mutée-pHluorine en A) et de la LuPME1-pHluorine en B) en épiderme de tabac 72h après transformation.

Figure III.3 : Analyse par Western blot de la fusion LuPME1mutée-pHluorine exprimée en épiderme de tabac.

Figure III.4 : Localisation des fusions LuPME1mutée-pHluorine (A) et LuPME1-pHluorine (B) en épiderme de tabac après 20 minutes de plasmolyse avec du glycérol 30%.

Figure III.5 : Localisation des fusions LuPME1mutée-pHluorine (A) et la LuPME1-pHluorine (B) en épiderme de tabac après 20 minutes de plasmolyse avec du $CaCl_2$ 0,5M.

Figure III.6 : Analyse par western blot de la fusion LuPME1-pHluorine produite en bactérie et purifiée.

Figure III.7 : Séquence de la protéine AT5G11420 appartenant à la famille DUF642.

Figure III.8 : Expression de la fusion AT5G11420-pHluorine en épiderme de tabac. Observation au microscope confocal 72h après infiltration.

Figure III.9 : Localisation de la fusion AT5G11420-pHluorine en épiderme de tabac après 20 minutes de plasmolyse avec du glycérol 30%.

Figure III.10 : Localisation de la fusion AT5G11420-pHluorine en épiderme de tabac après 20 minutes de plasmolyse avec du $CaCl_2$ 0,5M.

Figure III.11: Localisation des fusions pariétales au niveau d'une jonction intercellulaire.

Figure III.12 : Hétérogénéité de ratios de fluorescence dans l'apoplasme.

Figure III.13 : Mesure des ratios de fluorescence le long d'un lobe d'une cellule épidermale exprimant la fusion AT5G11420-pHluorine.

Tableau III.1 : Liste des lignées exprimant les acidines ou la pHluorine sous le contrôle des promoteurs Ubiquitine 10 (UBQ10), 35S dans différents sous domaines de l'apoplasme : PM-Apo, Apo et dans la paroi (LuPME1, LuPME1mutée et AT5g11420).

Figure III.14 : Phénotype de la racine primaire des lignées pariétales LuPME1-pHluorine, LuPME1mutée-pHluorine, AT5g11420-pHluorine et du contrôle PM-Apo pHluorine T2 de 6j ayant poussé sur un milieu MS sans vitamines, 1% saccharose, MES pH5,8 et phytagel 0,8%.

Figure III.15 : Phénotypage des poils racinaires des lignées contrôle sauvage (WT) et PM-Apo pHluorine et des lignées pariétales LuPME1-pHluorine, LuPME1mutée-pHluorine, AT5G11420-pHluorine de 6j ayant poussé sur un milieu MS sans vitamines, 1% saccharose, MES pH5,8 et phytagel 0 ;8%.

Figure III. 16 : Analyse par western blot de la taille et l'intégrité des fusions pariétales pHluorine stablement exprimées dans des plantules d'Arabidopsis de 6j.

Figure III.17 : Patrons de fluorescence observés dans des lignées T2 avec des plantules de 6j exprimant la fusion PME1-pHluorine (A), PME1mutée-pHluorine (B) et AT5G11420-pHluorin (C).

Figure III.18 : Patrons de fluorescence des fusions pariétales dans l'apex de racines primaires de 5 à 6j.

Figure III.19 : Comparaison des zones de division et de transition des différentes fusions pariétales.

Figure III.20 : Patrons de fluorescences dans la zone de transition avec la pHluorine ancrée à la membrane plasmique (PM-Apo), adressée à la paroi (LuPME1mutée) et sécrétée dans l'apoplasme (Apo). (A→ C) Vue longitudinale et (D → F) Sections orthogonales.

Figure III.21 : Comparaison de la zone de transition d'une plantule exprimant la version LuPME1mutée-pHluorine en A) et la LuPME1-pHluorine en B).

Figure III.22 : Marquages de la paroi obtenus dans la coiffe des racines primaires d'arabidopsis de 5j pour les lignées exprimant A) LuPME1mutée-pHluorine, B) AT5G11420-pHluorine, C) PM-Apo et D) Apo-pHluorine.

Figure III.23 : Marquage des HGs déméthylés de la coiffe par le COS^{647} et des régions pariétales couvertes par les senseurs de pH pariétaux. A) PM-Apo B) Apo-pHluorine C) LuPME1m-pHluorine et D) AT5G11420-pHluorine.

Figure III.24 : Ratios de fluorescence mesurés dans la face transversale des cellules de la columelle des senseurs de pH pariétaux AT5G11420-pHluorine et LuPME1m-pHluorine vs PM-Apo pHluorine.

Figure III.25 : Images ratiométriques des pointes racinaires des plantules d'Arabidopsis de 5j exprimant les fusions pariétales A) LuPME1mutée- pHluorine, B) LuPME1-pHluorine, C) Fusion AT5G11420.

Figure III.26 : Profil longitudinal des ratios de fluorescence moyens (390/475) de racines d'Arabidopsis exprimant les fusions LuPME1mutée-pHluorine (bleu), AT5G11420-pHluorine (rouge) ou la PM-Apo (noir).

Figure III.27 : Profil longitudinal des ratios de fluorescence moyens (390/475) de racine primaire de plantules exprimant la fusion LuPME1-pHluorine.

Figure III.28 : Calibration *in vivo* d'une plantule exprimant la fusion AT5G11420-pHluorine réalisée au microscope ratiométrique.

Figure III.29 : Gammes de calibration *in vivo* obtenues à partir des ratios de fluorescence (390/475) dans les zones DZ, TZ et EZ des fusions pariétales LuPME1mutée-pHluorine et AT5G11420-pHluorine.

Figure III.30 : Gammes de calibration *in vivo* obtenues à partir des ratios de fluorescence (390/475) de racines primaires d'Arabidopsis exprimant le senseur de pH LuPME1-pHluorine.

Tableau III.2 : Liste des plantes sauvages (Col8) et lignées de mutants et surexpresseur exprimant la pHluorine ou les Acidine 2 et 4 dans les différents sous domaines de l'apoplasme : PM-Apo, Apo et LuPME1mutée.

Figure III.31 : Phénotypage des poils racinaires des lignées contrôle sauvage (WT) et LuPME1mutée-pHluorine, du mutant pme17-1 et des mutants aha2.4 et pme17-1 exprimant la LuPME1mutée-pHluorine de 6j ayant poussé sur un milieu MS sans vitamines, 1% saccharose, MES pH5,8 et phytagel 0,8%.

Figure III.32 : Observation au microscope confocal du marquage fluorescent observé dans les poils racinaires de plantules pme17-1 exprimant la fusion LuPME1mutée-pHluorine sous contrôle du promoteur *EXPA7*.

Figure III.33 : Effet de l'EGCG 200µM sur le pH de la paroi de la zone de transition de plantules d'Arabidopsis de 5j.

Figure III.34 : Observation au confocal d'un poil racinaire émergeant exprimant la fusion LuPME1mutée-Acidine4 (A et B) ou la LuPME1mutée-pHluorine (C et D).

Chapitre 4 : Cartographie des pH dans la baie de raisin

Figure IV.1 : Empreinte de baie de Grenache au stade vert, à véraison et à maturité sur un papier pH.

Figure IV.2 : Diversité des vacuoles dans un protoplaste de cellule de la pulpe coloré au rouge neutre.

Figure IV. 3 : Flux de sucres, de potassium, d'acides organiques et d'eau dans une cellule de la pulpe.

Figure IV.4 : Observation au microscope confocal de cellules de la pulpe de Grenache exprimant la fusion PM-Apo+1.5 pHluorine 15 jours après agro-infiltration.

Figure IV.5 : L'Oregon Green 488 est un fluorochrome vert sensible au pH qui pénètre entre les cellules et a déjà été utilisé pour marquer l'apoplasme.

Figure IV.6 : Observation au microscope confocal de coupes de baies de Cabernet Sauvignon marquées au niveau de la paroi A) Marquage 15min avec l'oregon green (20µM) + iodure de propidium (3µM) et 15min de rinçage.

Figure IV.7 : Observation au microscope confocal de coupes de baies d'Ugny blanc au stade vert co-marquées avec le COS^{488} (1µL/mL) et l'iodure de propidium (3µM).

Figure IV.8 : Observation au microscope confocal de coupes de baie de Grenache au stade vert 3 semaines après transformation avec la fusion vacuolaire AtAleu-Acidine2.

Figure IV.9 : Mesure du pH vacuolaire de cellules de baies de Grenache exprimant le senseur fluorescent AtAleu-Acidine2.

Figure IV.10 : Observation au microscope confocal de coupes de baie de Cabernet Sauvignon au stade vert après 15min d'incubation et 15min de rinçage avec 200µM d'Oregon Green 488.

Figure IV.11 : Le BCECF-AM est une sonde dérivée de la fluorescéine qui a la capacité de pénétrer dans les cellules et d'y acquérir des propriétés de fluorescence après hydrolyse de l'acétoxyméthyle ester.

Figure IV.12 : Observation au microscope confocal de coupes de baie de Cabernet Sauvignon au stade vert incubée avec 10µM de BCECF-AM pendant 45min puis rincée pendant 1h15.

Figure IV.13 : Mesures de pH de vacuoles de cellules de la pulpe de cabernet sauvignon réalisées avec la sonde fluorescente BCECF-AM.

Figure IV.14: Le FSTS est une sonde fluorescente verte ratiométrique dérivée de la fluorescéine.

Figure IV. 15 : Observation au microscope confocal de coupes de baies de Grenache au stade vert (A, C et D) et maturité (B) marquées après 30min d'incubation des coupes de Grenache dans du FSTS 100µM.

Figure IV.16 : Evolution du pH vacuolaire en fonction du stade de développement.

Figure IV.17 : Compilation des données de pH obtenues dans la vacuole avec l'AtAleu-Acidine2 et le FSTS et le pH du jus pressé en fonction du développement.

Annexes

Annexe 1 : Séquence de l'ADNc de la *Lupme1* (Al-Qsous et al., 2004).

Annexe 2 : Carte plasmidique de la fusion LuPME1-pHluorine clonée dans le vecteur binaire pDGB3alpha1.

Annexe 3 : Carte plasmidique de la fusion LuPME1-pHluorine clonée dans un vecteur pRsetB d'expression en bactérie.

Annexe 4 : Séquence du gène At5g11420.

Annexe 5 : Carte plasmidique de la fusion At5g11420-pHluorine.

Annexe 6 : Liste des produits entrant dans la composition des milieux de culture et leur référence.

Annexe 7 : Liste des amorces utilisées pour le génotypage des mutants aha2.4, cgr2/3 et pme17-1 et des surexpresseurs PME17OX, CGR2OX et CGR3OX.

Annexe 8 : Composition des tampons utilisés pour calibrer le pH *in vitro* et *in situ*.

Annexe 9 : Composition des tampons utilisés pour calibrer le pH *in vivo.*

Liste des abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AHA : Arabidopsis H^+-ATPases

Aleu : Aleuraine

Apo : Forme sécrétée des senseurs de pH

BCECF AM: 2',7'-Bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-Carboxy_Fluorescein, AcetoxyMethyl ester

BTP : Bis-Tris-Propane

Ca^{2+} : Calcium

CEC : Capacité d'Echange de Cations

Col8: écotype sauvage Columbia 8

COS: Chitosan OligoSaccharide

CrRLK : *Catharanthus roseus* Receptor-Like Kinase like

DZ : Zone de Division

EZ : Zone d'Elongation

EXP: Expansines

EYFP: Enhanced Yellow Fluorescent Protein

FSTS: Fluorescein-5-(and -6)-Sulfonic, Trisodium Salt

GB: Golden Braid

GFP: Green Fluorescent Protein

H^+ : Proton

HEPES : acide 4-(2-HydroxyEthyl)-1-Pipérazine Ethane Sulfonique

IP : Iodure de Popridium

K+ : Potassium

KO : Knock-Out

MES : acide 2-(N-morpholino) éthanosulfonique

mM : millimolaire

MP : Membrane Plasmique

mRFP: monomeric Red Fluorescent Protein

MS: Murashige and Skoog

OG: Oregon Green

PAE: Pectines acétlestérases

pH : Potentiel Hydrogène

PG : PolyGalacturonase

PIP : Plasma membrane Intrinsic Proteins

PL : Pectine Lyases

PM-Apo : Forme apoplasmique ancrée à la membrane plasmique des senseurs de pH

PME : Pectine Méthylestérase

PMEI : Pectine Méthylestérase Inhibitor

PSY1: Peptide containing Sulfated tyrosine1

RALF: Rapid Alkalinization Factor

ROS: Reactive Oxygen Species

SYFP2: Synthetic Yellow Fluorescent Protein2

TagBFP2: Blue Fuorescent Protein2

Ws: Wassilewskija

XTH: Xyloglucane endotransglycosylase/ hydrolase

YEB: Yeast Extract Beef

ZT : Zone de Transition

µM : micromolaire

Avant-propos

Avant-propos

Le laboratoire que j'ai intégré pour réaliser ma thèse est l'unité de recherche mixte Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes (B&PMP) sur le campus INRAE de Montpellier. Les recherches qui y sont menées visent à comprendre les mécanismes associés à la nutrition hydrominérale des plantes et leurs réponses face à un changement environnemental. L'équipe KalipHruit qui m'a accueillie s'intéresse plus particulièrement à la qualité des raisins au cours de leur développement en lien avec les flux potassiques et le pH.

Mon projet de thèse consistait en l'étude de l'impact du changement climatique, plus particulièrement l'augmentation des températures, sur l'acidité des baies de raisin au cours de leur maturation en lien avec la charge en potassium. Le potassium, le pH et les acides organiques sont fortement interconnectés et gouvernent la perception de l'acidité des raisins et du vin. La modification de leur concentration respective sous l'effet de températures élevées conduit à une altération du goût du vin, de sa robe, de son bouquet et à un moindre potentiel de vieillissement. L'hypothèse de travail de l'équipe KalipHruit au sein de laquelle j'ai effectué ma thèse est qu'il existe un lien entre le pH de la baie, les mécanismes moléculaires conduisant au chargement en potassium et l'expansion des cellules de la baie de raisin.

La vigne se positionne parmi les espèces à fruits charnus ayant le plus fort impact socio-économique dans le monde (FAOSTAT, 2018). La culture de la vigne est hautement dépendante de son environnement, de la composition du sol, des conditions climatiques et des pratiques viticulturales (Downey et al., 2015). Dans un contexte de changement climatique et selon les scénarios d'émission de gaz à effet de serre, l'augmentation des températures prédite va de 1,8 à 4°C à la fin du 21ème siècle (GIEC). Une telle augmentation des températures a une incidence sur le cycle de développement des baies de raisin qui arrivent à maturité plus tôt. Elle affecte l'accumulation de métabolites primaires au cours du développement avec pour conséquence un déséquilibre du rapport sucre/acide qui est un déterminant majeur de la qualité des vins. Plus particulièrement, ces fortes températures conduisent à une augmentation de la teneur en potassium, un cation majoritaire qui joue un rôle important dans la neutralisation des acides organiques (Mira de Orduña, 2010). De facto, on observe depuis ces 10 dernières années une augmentation du pH des moûts et une diminution de la concentration en acide malique. Les mécanismes impliqués dans la chute de l'acidité des raisins en réponse à des températures élevées restent méconnus à ce jour. Chez la vigne, l'activité de certains canaux potassiques du type shaker localisés à la membrane plasmique est essentielle au chargement de potassium dans la baie et est également régulée par le pH (Cuellar et al., 2013 ;

Nieves-Cordones et al., 2018 ; Villette et al., 2019). Le chargement du potassium dans la baie de raisin initie les flux d'eau qui entrainent la turgescence de la vacuole et ainsi l'expansion des cellules. Aussi, l'expansion des cellules ne peut avoir lieu sans le relâchement de la paroi qui est secondaire à une acidification de l'espace apoplasmique. Ainsi, la régulation du pH de l'apoplasme joue un rôle multiple dans l'expansion des cellules. D'une part, par le biais de la régulation des mécanismes de transport conduisant à la turgescence de la cellule et d'autre part en régulant les enzymes responsables du relâchement de la paroi.

L'apoplasme est un environnement complexe et hétérogène qui comprend les espaces intercellulaires et la paroi pecto-cellulosique dont le pH diffère à proximité de la membrane plasmique ou dans l'espace libre de diffusion (Martinière et al., 2018). L'activité des pompes à protons ATPases exprimées à la membrane plasmique est connue pour jouer un rôle important dans la régulation du pH apoplasmique. Par ailleurs, il est suggéré que la capacité d'échange de cations de la paroi pecto-cellulosique soit impliquée dans la régulation du pH apoplasmique. En effet, les pectines constituent le plus important réservoir de charges de la paroi. La présence de charges au niveau des pectines est modulée par l'action des pectine-méthylestérases (PME) qui libèrent des protons et génèrent des groupements chargés négativement. Récemment, chez Arabidopsis, il a été proposé que l'état de méthylestérification des pectines jouerait un rôle dans l'expansion des cellules (Haas et al., 2020). Chez la vigne, deux PME (VvPME2 et VvPME17), ont été identifiées dans des QTLs liés au pH dans des baies issues d'un croisement entre deux cépages contrastés en acidité suggérant un lien entre état de méthylation des pectines et pH (Duchêne et al., 2012). Une simple empreinte de baie coupée sur un papier pH illustre la forte hétérogénéité de pH des tissus de la baie. Toutefois, dans le raisin, peu de données de pH sont disponibles à l'échelle cellulaire.

Pour répondre à cette problématique, deux modèles fortement interconnectés ont donc été utilisés: la baie de raisin et la racine primaire d'Arabidopsis. La situation sanitaire actuelle a négativement impacté le travail sur les baies car nous n'avons pu respecter le calendrier et obtenir des vignes permettant de réaliser les expérimentations sur raisin en 2020. De ce fait, le modèle Arabidopsis a été plus développé qu'initialement prévu.

Les travaux présentés dans ce manuscrit portent sur le développement d'outils d'imagerie et en particulier de biosenseurs fluorescents permettant de mesurer le pH *in vivo* avec des données préliminaires en baie de raisin.

Introduction

Introduction

I. La croissance des cellules végétales

La croissance d'un organe est définie par les processus qui conduisent à une augmentation de sa masse et de son volume grâce à la prolifération et l'expansion des cellules. Pour s'allonger, les cellules végétales qui sont entourées d'une paroi pecto-cellulosique rigide font intervenir deux mécanismes : la turgescence résultant du gonflement de la vacuole et le relâchement de la paroi. Ces mécanismes dépendent de l'activité des pompes à protons membranaires H^+-ATPases de type P. Les H^+-ATPases excrètent des protons hors de la cellule, ce qui hyperpolarise la membrane plasmique et active les canaux dépendant du potentiel de membrane. Il en résulte une entrée de cations dans la cellule, et plus particulièrement de K^+, qui entraine des flux d'eau dans la vacuole qui va se gonfler et exercer une pression de turgescence sur la paroi. En parallèle, l'acidification de l'espace apoplasmique dû à l'activité des H^+-ATPases entraine le relâchement de la paroi : un mécanisme qui est au cœur de la théorie de la croissance acide (Rayle, 1973). La théorie de la croissance acide souligne le rôle de régulateur de la phytohormone auxine qui active les H^+-ATPases par le biais d'un évènement de phosphorylation et entraine une chute du pH apoplasmique à ~pH4,5. La théorie de la croissance acide a été étudiée dans de nombreux organes comme le coléoptile, l'hypocotyle et la racine primaire d'Arabidopsis thaliana (Cleland, 1976 ; Fendrych et al.,2016 ; Barbez et al., 2017). L'activité des H^+-ATPases est aussi négativement régulée par l'interaction du récepteur kinase FERONIA avec des peptides RALF (Rapid Alkalinization Factor) (Wolf et Hofte, 2014), interaction qui conduit à une alcalinisation de l'apoplasme et a une réduction de l'élongation cellulaire (Haruta et al., 2014 ; Gjetting et al., 2020).

L'acidification du pH apoplasmique confère un environnement favorable (~pH4,5) à l'activité des expansines, protéines non enzymatiques, qui participent au relâchement de la paroi (Cosgrove, 2005) en modifiant les liaisons entre cellulose et xyloglucanes. La chute du pH apoplasmique impacte également d'autres protéines pariétales comme les pectines méthylestérases (PME), ce qui modifie l'extensibilité et la porosité de la paroi. En particulier, les PMEs vont impacter l'interaction du calcium (Ca^{2+}) avec certains composants de la paroi et ainsi en moduler les propriétés mécaniques. L'état de méthylestérification des pectines semble également interconnecté avec les propriétés de croissance d'un organe. Par exemple, dans la tige d'Arabidopsis, la prédominance de pectines méthyl estérifiées est associée à une croissance rapide (Phyo et al., 2017). Récemment, un rôle direct des pectines dans l'expansion cellulaire des cellules épidermales d'Arabidopsis a été proposé (Haas et al., 2020). Dans ce modèle, les

auteurs proposent que l'expansion de la paroi serait dirigée par la déméthyl-estérification enzymatique des pectines qui provoquerait un gonflement des nanofilaments pectiniques et conduirait à la courbure de la paroi et à la formation du lobe. Ce concept propose un rôle de l'état de méthyl estérification des pectines actif et dominant dans la croissance aux dépens du rôle de la turgescence de la cellule et du relâchement des microfibrilles dans la paroi (Haas et al., 2020 ; Cosgrove et Anderson, 2020).

Dans le contexte de mes travaux de thèse, l'élongation des cellules en lien avec des variations de pH apoplasmique est abordée dans deux systèmes : le raisin et la racine primaire d'Arabidopsis thaliana.

II. Description anatomique et physiologique des deux modèles étudiés

1. La baie de raisin

La vigne est une plante annuelle, pérenne et ligneuse Angiosperme Dicotylédone qui appartient au genre *Vitis* et à la famille des Vitacées et qui produit des fruits : les raisins. Son cycle de développement annuel est décrit sur la base de changements morphologiques par des stades phénologiques (événements annuels périodiques) dépendant des variations climatiques (Baggiolini, 1952 ; Eichlorn et Lorenz, 1977). Le cycle biologique se décompose en un repos hivernal suivi d'un cycle végétatif qui comprend un cycle reproducteur au cours duquel les raisins se forment à partir des fleurs et accumulent eau, solutés et acides organiques durant leur maturation. Le développement de la vigne et des raisins est fortement influencé par le climat ce qui *in fine* impacte la typicité des vins (Van Leeuwen et al., 2004 ; Droulia et Charalampopoulos 2021).

D'un point de vue anatomique, la baie est majoritairement composée de 3 tissus : l'exocarpe, également appelé pellicule, le mésocarpe ou pulpe et l'endocarpe qui entoure les pépins (Figure I.1).

La pellicule représente 10 à 15% du poids total de la baie mature. Elle est formée d'une cuticule recouverte d'une cire qui assure la protection du fruit, d'un épiderme généralement unicellulaire et d'un hypoderme contenant une dizaine d'assises cellulaires (Hardie et al., 1996). La pellicule contient une grande quantité d'anthocyanes qui confèrent aux cépages colorés leur couleur rouge.

La pulpe constitue 80 à 95% du poids frais de la baie à maturité. Les cellules du mésocarpe ont une forme isodiamétrique et sont reparties sur une trentaine de couches (Diakou et Carde, 2001).

Le mésocarpe est parcouru par du tissu vasculaire composé de xylème, de phloème et de parenchyme vasculaire. Le système vasculaire est organisé en un large faisceau central qui relie le pédicelle aux pépins et un réseau de petits faisceaux périphériques qui contiennent majoritairement du phloème. Les cellules de la pulpe accumulent de l'eau, du potassium (K^+), du sucre, des acides organiques et des nutriments dans la vacuole qui représente près de 99% de son volume (Diakou et Carde, 2001).

Enfin, l'endocarpe est constitué de quelques cellules en contact avec les loges carpellaires qui entourent les pépins. Ces derniers sont composés d'un tégument, d'un albumen et d'un embryon et représentent 6% du poids de la baie mature.

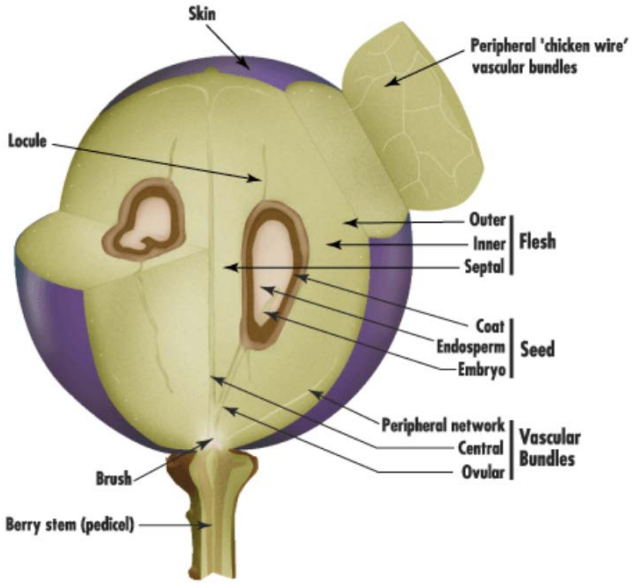


Figure I.1 : Coupe longitudinale d'une baie de raisin. D'après Kennedy et al., 2002.

Le développement de la baie est divisé en trois stades : le stade vert ou herbacé, une phase de latence qui est suivie de la véraison et enfin le stade de maturation. Au cours du développement, la croissance de la baie de raisin est caractérisée par une évolution de son poids et de son volume selon une double sigmoïde (Coombe 1992) grâce à une accumulation d'eau et de solutés (Figure I.2).

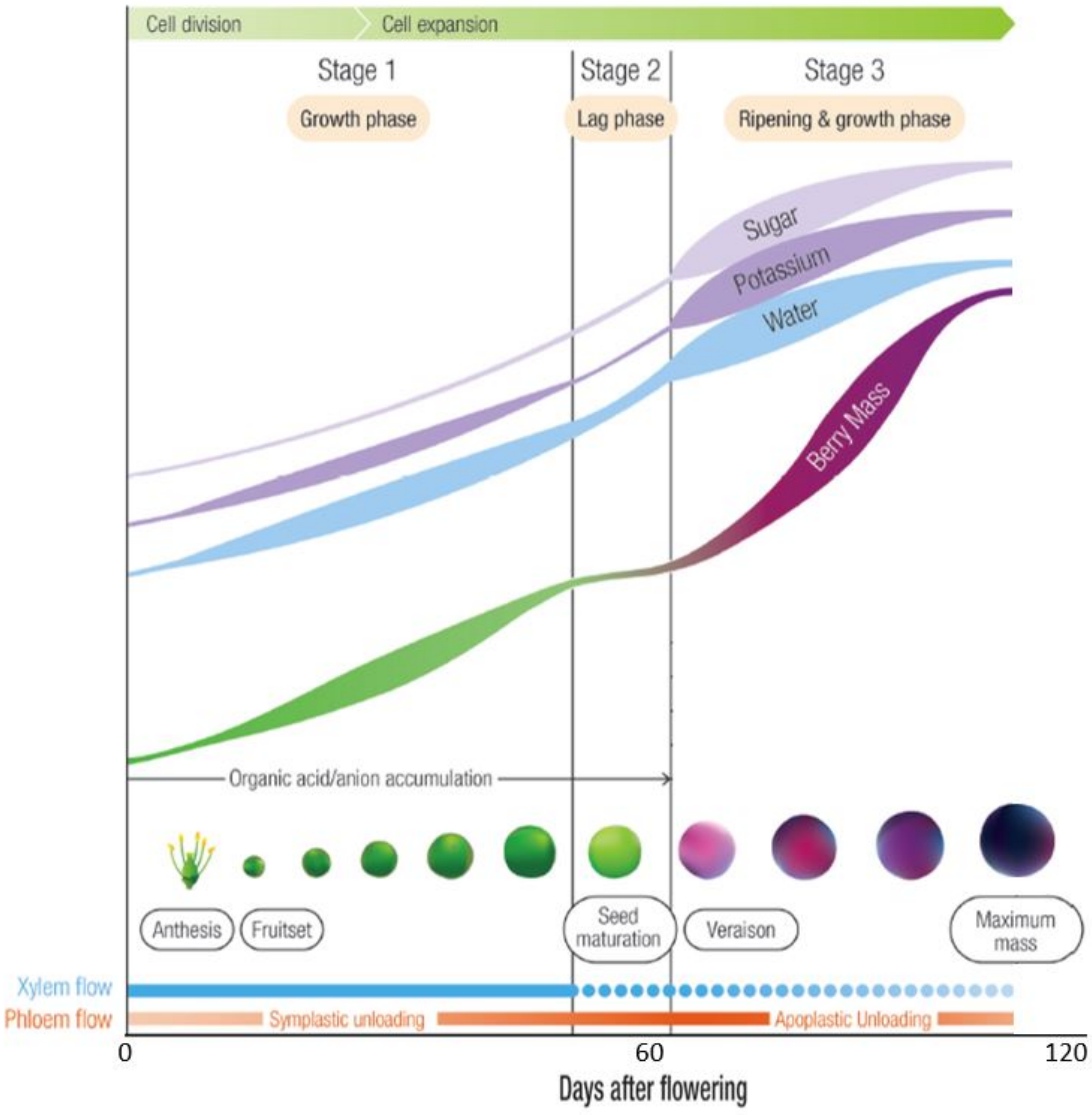


Figure I.2 : Schéma du développement de la baie de raisin. Les trois stades principaux : stade vert, de latence et de maturation sont représentés en fonction du nombre de jours après floraison. La croissance suit une courbe double sigmoïde en parallèle de l'accumulation d'eau, de K^+ et de sucres. Le degré d'accumulation est schématisé par l'épaisseur du trait. A partir de la phase de latence, les flux d'eau et de solutés se font uniquement par le phloème. Dans un premier temps, le volume de la baie augmente par division cellulaire puis uniquement par expansion cellulaire dès le milieu du stade vert. D'après Rogiers et al., 2017.

Le stade vert est le premier stade après nouaison (événement au cours duquel l'ovule se transforme en fruit). A ce stade, les baies présentent une forte activité photosynthétique et la croissance se fait presque exclusivement grâce à la division cellulaire. Les acides organiques majoritaires tels que l'acide tartrique et l'acide malique sont synthétisés et accumulés dans les

vacuoles des cellules du mésocarpe à hauteur de 100mM et de 30 à 50mM, respectivement (Terrier et al., 2001). Le pH de la vacuole est maintenu à une valeur très acide, autour de pH 2,5 (Ruffner, 1982). En revanche, les sucres sont faiblement représentés (~150mM maximum) (Li et al., 2021). A ce stade, c'est le xylème qui assure majoritairement les flux d'eau, de sucres et de solutés tels que le K^+ qui s'accumule lentement.

Approximativement 40j après floraison, la baie entre dans une phase de latence qui est caractérisée par un ralentissement de son développement et de sa croissance. Cette phase de latence s'achève par la véraison. La véraison est une étape charnière du développement de la baie et est caractérisée par de nombreux bouleversements biochimiques et physiologiques associés à un changement de couleur pour les raisins rouges (Figure I.2) (Coombe et McCarthy, 2000). La véraison est marquée par la fermeture de la voie symplastique, ainsi, le déchargement se fait exclusivement par le phloème et uniquement par le biais de la voie apoplasmique. De plus, il n'y a plus de division cellulaire et l'accroissement du volume de la baie n'est désormais plus assuré que par une expansion cellulaire grâce aux flux d'eau et de solutés depuis les organes sources.

Enfin, la baie entre dans la phase de maturation durant laquelle les acides organiques ne sont plus accumulés et l'acide malique est dégradé par le biais de la respiration cellulaire. En parallèle, la baie va massivement accumuler du K^+ (jusqu'à 5mg de matière sèche à maturité, Rogiers et al., 2006), des sucres (jusqu'à 1M à maturité, Fillion et al., 1999) et des métabolites secondaires. Le K^+ et les sucres sont les osmoticum majoritairement responsables des flux d'eau qui constituent la force motrice à l'origine de la croissance de la baie.

Les nombreux changements métaboliques et physiologiques qui surviennent au cours du développement de la baie vont impacter le rapport sucre/acide qui est un paramètre déterminant dans la qualité du raisin. Au moment de la maturité, le pH des vacuoles de la baie se situe autour de 3,5 (Ruffner, 1982). Il est influencé par la balance entre formes anioniques des acides tartrique et maliques et du cation majoritaire : le K^+. Une altération de la concentration d'un de ces facteurs perturbe l'homéostasie du pH de la baie et compromet la typicité des vins (Hale 1977, Boulton 1980, Walker et Blackmore 2012, Duchêne et al., 2019). La fin de la maturité est marquée par une chute de l'accumulation de solutés et d'eau ce qui se traduit par une diminution du volume de la baie et un flétrissement.

2. La racine primaire d'*Arabidopsis thaliana*

Son petit génome, son cycle de reproduction court et sa facilité de culture et de transformation font d'*Arabidopsis thaliana* une plante modèle et un outil puissant pour étudier les phénomènes physiologiques des plantes. En particulier, du fait de la simplicité de son organisation, sa racine primaire est très étudiée dans le cadre de la croissance et du développement d'un organe (Svolacchia et al., 2020).

La racine primaire d'Arabidopsis est composée de 5 couches de tissus distincts, du plus externe au plus interne : l'épiderme, le cortex, l'endoderme, la stèle et le péricycle qui entoure les vaisseaux du phloème et du xylème (Dolan et al., 1993). L'épiderme est constitué de deux types tissulaires, un qui donnera des poils racinaires et un qui n'en donnera pas, qui sont organisés en files de cellules contiguës. Dans cette organisation radiale et symétrique (Figure I.3, droite), chaque couche cellulaire possède des caractéristiques physiologiques qui lui sont propres permettant le prélèvement des nutriments du sol par l'épiderme mature et leur transport vers les parties aériennes. Alors que l'espace intercellulaire est en continuité avec le sol, de l'épiderme jusqu'à la bande de Caspari, on observe un gradient radial d'acidification avec le pH apoplasmique plus acide de 0,4 unité dans l'endoderme qu'à l'interface entre le milieu extérieur et l'épiderme (Martinière et al., 2018).

L'apex racinaire recouvert d'une cuticule (Berhin et al., 2019) est protégé par la coiffe, un tissu impliqué dans la perception de la gravité et qui est composé de deux types cellulaires : les cellules de la columelle organisées en 4 à 6 couches et les cellules latérales.

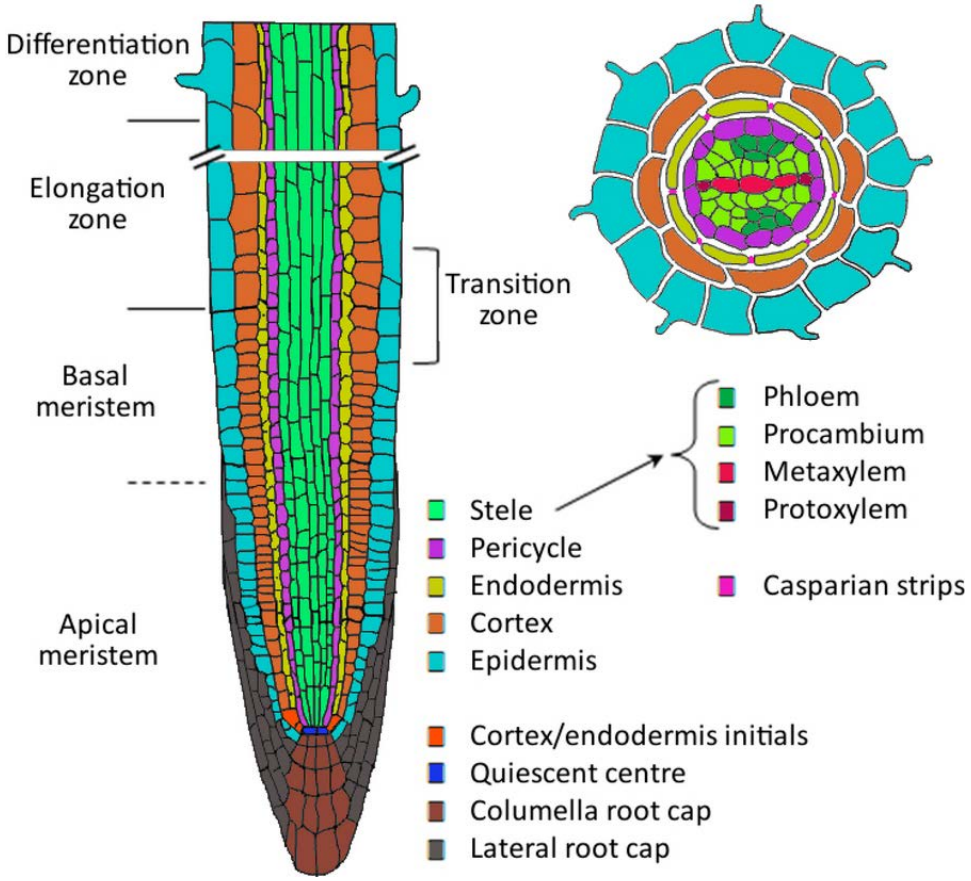


Figure I.3 : Organisation de la racine primaire d'Arabidopsis. La coupe transversale révèle les différents types cellulaires organisés de façon concentrique. En partant de l'extérieur, l'épiderme, le cortex, l'endoderme, la stèle et le péricycle qui entoure les vaisseaux du phloème et du xylème. En longitudinal, la racine est divisée en quatre zones : la zone méristématique où les cellules se divisent, la zone de transition où les cellules se préparent à l'élongation, la zone d'élongation et la zone de différentiation. D'après De Smet et al., 2015.

La racine primaire d'Arabidopsis est également organisée en 4 zones distinctes selon son axe longitudinal (Figure I.3, gauche). En partant de l'apex racinaire, on retrouve la zone méristématique, la zone de transition, la zone d'élongation et la zone de différenciation. Chez l'écotype Columbia 0, la zone méristématique s'étend jusqu'à 200µm à partir de la jonction entre la coiffe et l'apex racinaire, la zone de transition couvre une zone de 200 à 520µm et la zone d'élongation s'étend jusqu'à 850µm dans des conditions de croissance optimale (Verbelen et al., 2006). Au cours de leur vie, les cellules passent par une série de phases développementales qui commencent dans le méristème apical racinaire ; une zone d'intenses divisions cellulaires. On y retrouve le centre quiescent qui est composé de 4 cellules souches centrales possédant une faible activité mitotique et qui sont à l'origine de la mise en place et de la maintenance du méristème (Petricka et al., 2012). Elles se divisent asymétriquement pour

donner des cellules filles qui se diviseront à leur tour de nombreuses fois avant d'entrer en expansion et de former les types cellulaires des différents tissus composant la racine mature. A partir de 5j après germination, la zone méristématique atteint sa taille définitive (Perilli et Sabatini, 2010). Le changement de taille des cellules méristématiques distales (ratio longueur/largeur) fait partie des critères morphologiques pour identifier la position de la zone de transition (ZT) qui est une zone charnière de la racine.

La ZT est composée d'une dizaine de cellules maximum qui acquièrent les propriétés métaboliques et architecturales leur permettant d'initier le processus d'élongation. L'élongation d'abord lente dans la partie apicale de la ZT s'accélère dans la partie proximale. Cette zone, qui présente une grande sensibilité aux facteurs environnementaux tels que la gravité, l'humidité ou la lumière, joue un rôle déterminant dans la taille du méristème et la croissance de la racine. Le strict maintien de la position de la ZT est donc essentiel à la croissance et à l'organogenèse de la racine primaire et détermine la taille du méristème (Verbelen et al., 2006, Pacifici et al., 2015). La position de la zone de transition est associée à une activité antagoniste des phytohormones auxines et cytokinines (Salvi et al., 2020). De plus, la distribution d'auxine dans la racine primaire est minimale au niveau de la zone de transition (Svolacchia et al., 2020). On observe également une chute progressive du pH apoplasmique qui passe de 5,6 au niveau des cellules distales du méristème à 5,4 à la fin de la zone de transition quand les cellules comment à s'allonger rapidement (Staal et al., 2001).

Dans la zone d'élongation rapide, la taille des cellules peut augmenter de 300% en moins de 3 heures. La vacuole centrale se développe via l'entrée d'eau et de solutés ce qui a pour effet de déplacer le noyau d'une position centrale contre la membrane plasmique (MP). La pression de turgescence qui en résulte permet l'expansion des cellules qui, dans la racine est anisotrope, en partie à cause de l'orientation des microfibrilles de cellulose dans le sens longitudinal (Verbelen et al., 2006).

Une fois, arrivées au terme de leur expansion, les cellules continuent leur différenciation et entrent dans un processus de maturation au cours duquel elles vont acquérir leurs caractéristiques morphologiques et physiologiques finales. Les atrichoblastes vont maintenir leur forme tandis qu'un poil racinaire émerge des trichoblastes (Balcerowicz et al., 2015).

La combinaison de la division des cellules dans la zone méristématique et de leur élongation dans la zone d'élongation conduit à la croissance de la racine primaire d'Arabidopsis. Néanmoins, chez certaines accessions d'Arabidopsis, la variabilité de la taille du méristème

racinaire ne permet pas toujours d'expliquer la taille de la racine suggérant que l'expansion des cellules serait le facteur explicatif principal dans la détermination de la taille de la racine primaire (Aceves-Garcia et al., 2016).

III. L'espace apoplasmique : un environnement complexe et hétérogène

L'apoplasme désigne le compartiment externe à la membrane plasmique au-delà du symplaste (Figure I.4). Il inclut la paroi pecto-cellulosique, du fluide apoplastique et des espaces intercellulaires et comprend le xylème (Canny, 1995). Il est aussi décrit comme le compartiment physiologique externe des cellules végétales dans lequel le maintien de l'homéostasie est essentiel (Sakurai, 1998) car il est impliqué dans de nombreux processus physiologiques et particulièrement dans la nutrition, la communication entre les cellules, la croissance et l'interaction avec l'environnement.

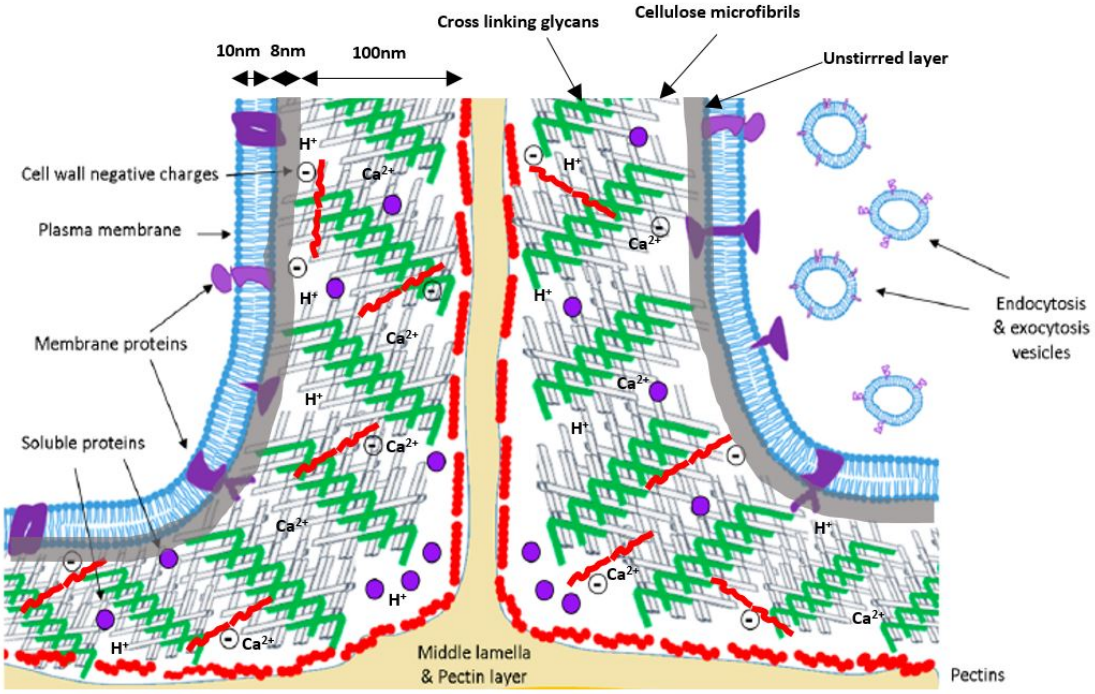


Figure I.4 : Représentation schématique de l'espace apoplasmique. On trouverait au contact de la membrane plasmique une zone relativement peu agitée « l'unstirred layer » qui est représenté en gris. L'espace apoplasmique d'une centaine de nanomètres est majoritairement occupé par la paroi pectocellulosique composée d'une matrice de microfibrilles de cellulose (blanc) interagissant avec des complexes de polysaccharides (pectines en rouge et xyloglucanes en vert) et des protéines (violet). La charge globale de la paroi est négative du fait de la présence de nombreux groupements de pectines déméthylées. Ces charges négatives interagissent avec les

cations et notamment le Ca^{2+}. Dans la lamelle moyenne (jaune), compartiment permettant une adhérence entre deux cellules, on retrouve majoritairement des pectines présentant différents patrons de méthylation/ déméthylation. Le fluide apoplastique n'est pas physiquement représenté sur le schéma et est supposé représenter tout l'espace de liquide entre les polysacharides. D'après Guerra-Guimaraes et al., 2016 et Martinière et al 2018.

Alors que la majorité du volume de l'apoplasme est occupée par la paroi primaire, l'utilisation d'une forme ancrée à la membrane plasmique de la pHluorine, un biosenseur de pH génétiquement encodé, a permis de mettre en évidence une possible « unstirred layer » (Figure I.4) où le pH est activement maintenu à des valeurs moins acides que dans le reste de l'apoplasme (Martinière et al., 2018). La paroi est une structure dynamique qui évolue et s'adapte tout au long de la vie de la plante. Elle confère forme, rigidité et protection aux cellules tout en possédant les propriétés d'extensibilité nécessaire au développement et à la croissance cellulaire. Elle joue un rôle central dans l'adhérence et la communication cellulaire et elle constitue une première barrière de protection face à l'environnement et notamment face aux stress biotiques (Hamann 2012). Elle impacte également la nutrition car les nutriments qui circulent dans l'apoplasme peuvent être adsorbés au niveau des charges qu'elle porte (Thornton et Macklon 1989). La paroi est composée d'un complexe de polysaccharides dont les microfibrilles de cellulose qui sont synthétisées par la cellulose synthase, localisée à la MP, et sécrétées dans la paroi. Guidées par le cytosquelette, elles sont assemblées à la surface de la cellule avec d'autres polysaccharides : les hémicelluloses et les pectines ainsi que de glycoprotéines pour former un réseau complexe (Figure I.4). Les protéines peuvent être solubles dans l'apoplasme ou interagir avec les polysaccharides de la paroi par des liaisons faibles (Boudart et al., 2005). Ce réseau présente un maillage avec des espaces inter fibrillaires d'une taille de 3,5 à 5 nm qui constitue une contrainte de diffusion majeure pour les molécules de haut poids moléculaire (Carpita et al., 1979).

Les pectines, polysaccharides riches en acides galacturoniques, représentent les composants majoritaires de la paroi primaire et constituent jusqu'à 35% de son poids sec (Hocq et al., 2017). Elles sont composées de 4 types de domaines macromoléculaires : les homogalacturonanes qui sont la forme majoritaire (jusqu'à 65%), les rhamnogalacturonanes de types I et II et les xylogalacturonanes. Dans la lamelle moyenne, on retrouve principalement des homogalacturonanes (HGs) et des rhamnogalacturonanes qui forment une structure gélifiée de charge globalement négative (Sattelmacher, 2001). Les pectines sont polymérisées dans le *cis* Golgi, méthylestérifiées dans le *trans* Golgi et modifiées avec des chaines latérales dans les

citernes du *trans* Golgi. Tout au long du développement des cellules, les pectines sont sécrétées et intégrées dans la paroi sous une forme hautement méthylestérifiée (Micheli, 2001). Une fois dans la paroi, elles sont modifiées de manière très contrôlée par des pectines méthylestérases (PME) qui catalysent le retrait des groupements méthyles (Mohnen et al., 2008).

Il existe de très nombreuses PME (66 chez *Arabidopsis thaliana*) qui possèdent chacune des spécificités de liaison et sont régulées par le pH environnant (Pelloux et al., 2007). Les gènes de PME codent pour des pré-pro-protéines, les régions pré et pro sont clivées au cours de la maturation et seule la partie mature des PME est retrouvée dans la paroi (Micheli, 2001). L'activité des PME va moduler la densité de pectines déméthylées et ainsi impacter les connections entre pectines et Ca^{2+}, ce qui va modifier la rigidité de la structure. On distingue deux modes d'action des PME selon le type de clivage, aléatoire ou linéaire (Denès et al., 2000). Lorsqu'elles catalysent la déméthylestérification des HGs de façon aléatoire, les PMEs génèrent des HGs déméthylés substrats des PGs (polygalacturonases) et relarguent des protons ce qui génère un environnement favorable à l'activité de ces PGs et participe au relâchement de la paroi (Figure I.5 (a)) (Xiao et al., 2014 ; Sénéchal et al., 2014). En revanche, les PME qui enlèvent les groupements méthyl linéairement, libèrent des blocs de groupes carboxyles libres qui vont servir de réservoir à cations et interagir notamment avec des ions Ca^{2+} et former du gel pectate (Goldberg et al., 1996), ce qui impacte les propriétés mécaniques de la paroi (Figure I.5 (b)). L'activité des PME est elle-même régulée par le pH et par des inhibiteurs : les Pectines Methylesterase Inhibitor (PMEis) (Jolie et al., 2010) dont la liaison aux PME peut aussi être activée par pH acide (Sénéchal et al., 2015). A pH acide, les PME sont chargées positivement et interagissent fortement avec les pectines non estérifiées. A pH basique, les PME sont proches de leur point isoélectrique et sont neutres ou chargées négativement et seraient peu associées à leur substrat du fait d'une répulsion électrostatique (Bordenave 1996). Pour ajouter de la complexité, le pH semble impacter le mode d'action de certaines PME qui génèrent des blocs déméthylés à pH alcalin et déméthylent aléatoirement à pH 4,5 (Denès et al., 2000).

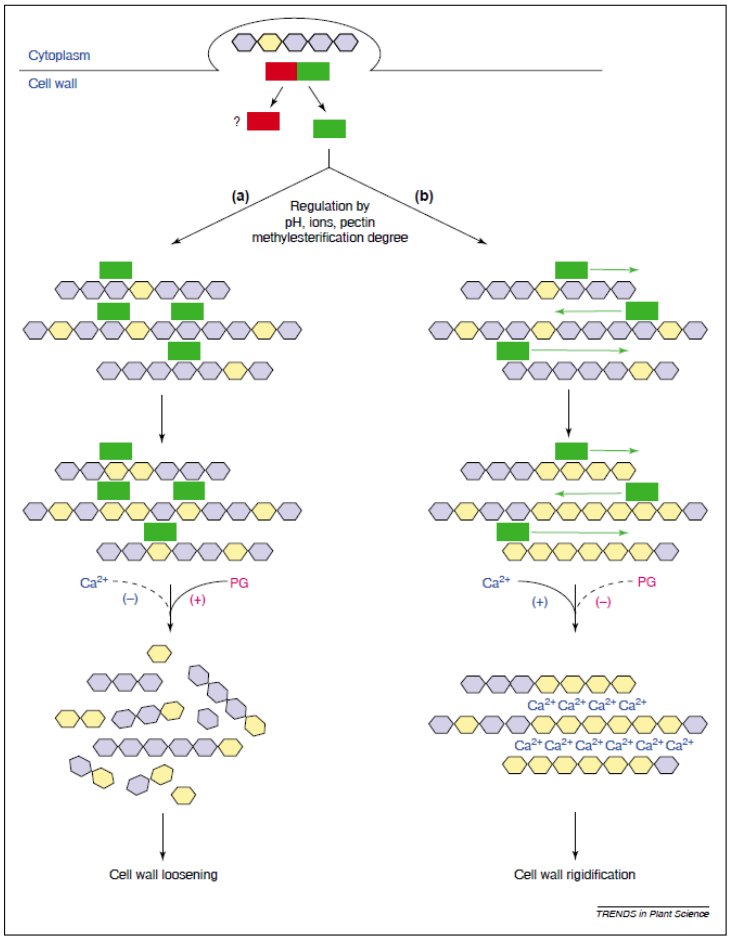


Figure I.5 : Les PMEs (région pro en rouge et partie mature en vert) exercent leur activité de déméthylation selon différents modes. a) Les acides galacturoniques méthylestérifiés (gris) sont aléatoirement déméthylestérifiés (jaune) rendant les HGs accessibles aux PGs qui les dégraderont avec pour conséquence un relâchement de la paroi. b) Les PMEs déméthylent les acides galacturoniques en bloc sur lesquels se fixent des ions Ca^{2+} conduisant à la formation d'un gel et à la rigidification de la paroi (Micheli, 2001).

La paroi est considérée comme un échangeur d'ions dont les charges interagissent avec les ions échangeables du fluide apoplastique (Grignon et Sentenac, 1991). La répartition des ions dans la paroi est caractérisée par les interactions électrostatiques qui conduisent à l'accumulation des cations. Le mouvement des ions peut être expliqué par le modèle de Donnan qui définit deux espaces, l'un dans lequel la diffusion des ions n'est pas restreinte par la présence de charges électriques : le Water Free Space et l'autre dans lequel les mouvements ioniques sont caractérisés par la présence d'anions non diffusibles : le Donnan Free Space, (Grignon et Sentenac, 1991). La présence de charges négatives au niveau des polymères de la paroi permet de fixer des cations et notamment du Ca^{2+}. Les charges positives sont majoritairement associées

aux protéines (Shomer et al., 2003). La paroi est considérée comme le plus important réservoir de Ca^{2+} dans les tissus de plantes avec une gamme de concentration d'une grande variabilité (60µM-330µM) (Demarty et al., 1984 ; Hocq et al., 2017). La quantité d'anions non diffusibles dans la paroi est quantifiée par la capacité d'échange de cation (CEC). La CEC est dynamique et varie en fonction des fluctuations environnementales comme le pH (Allan et Jarrell, 1989). Elle est modulée par action enzymatique et en particulier sous l'effet de l'activité des PME. De plus, la présence d'ions non diffusibles dans la paroi impacte le mouvement des ions diffusibles. Il n'existe cependant pas de séparation distincte entre les deux espaces définis par Donnan qui coexistent dans l'apoplasme (Grignon et Sentenac, 1991).

Le pH de part et d'autre de la membrane plasmique affecte les processus de transport au travers de la membrane plasmique et impacte directement l'absorption des nutriments. De ce fait, il est maintenu à des valeurs homéostatiques. Le pH apoplasmique module également l'extensibilité de la paroi et régule ainsi la forme des cellules, des organes et l'architecture des plantes. Il affecte aussi le mouvement de molécules de signalisation telle que l'auxine qui est protonnée/déprotonnée selon le pH environnant ce qui impacte son affinité avec des transporteurs/récepteurs et sa diffusion dans les cellules (Hohm et al., 2014).

Dans la zone mature de la racine, à distance de la MP, le pH apoplasmique semble plus acide que celui retrouvé à proximité de la membrane plasmique rendant complexe sa mesure par la version soluble de la pHluorine (Martinière et al., 2018). En revanche, l'utilisation de sondes fluorescentes comme l'HPTS ou l'Oregon Green suggère un pH de l'ordre de 5,4 dans cette même zone de la racine (Barbez et al., 2018). Ces données suggèrent l'existence d'un gradient de pH au sein de l'apoplasme. Le pH apoplasmique est principalement régulé par l'activité des H^+-ATPases présentes à la membrane plasmique (Haruta et al., 2010). L'activité des transporteurs tonoplastiques (Ca^{2+}/H^+) CAX participerait également à cette régulation (Conn et al., 2011 ; Cho et al., 2011). Plus récemment, il a été proposé que la déméthyl-estérification des pectines contribuerait à une acidification locale de l'apoplasme (Hocq et al., 2017).

Une partie de ces mécanismes est détaillée dans la partie suivante qui contextualise l'état de nos connaissances sur les mécanismes de l'élongation cellulaire dans les modèles raisin et racine primaire d'Arabidopsis.

IV. Les mécanismes de l'élongation cellulaire

1. Déclenchement et mécanisme d'élongation cellulaire

Le rôle de l'auxine dans l'expansion de certains types cellulaires et notamment des cellules de l'hypocotyle est bien décrit (Rayle et Cleland, 1980 ; Fendrych 2016). Ainsi, cette phytohormone agit à deux niveaux : à court terme, elle impacte la plasticité de la paroi via l'activation des H^+-ATPases membranaires, des pompes à protons localisées à la membrane plasmique qui transportent des protons hors de la cellule et jouent un rôle primordial dans l'homéostasie du pH de l'apoplasme (Figure I.6).

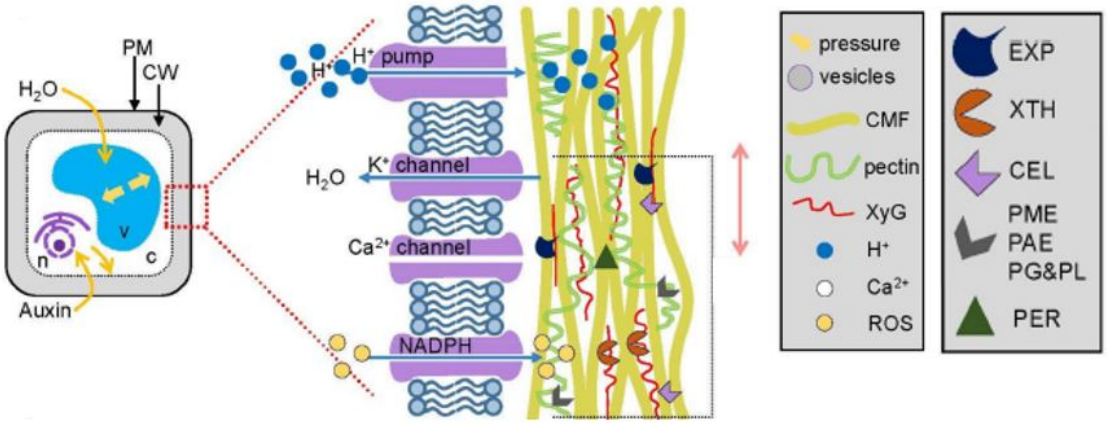


Figure I.6 : L'élongation d'une cellule de racine – première étape : préparation à l'élongation. L'activation des pompes à protons membranaires H^+-ATPases entraine une acidification de l'apoplasme (H^+ = ronds bleus) avec pour conséquence la dépolarisation de la membrane plasmique, l'influx de K^+ et l'entrée d'eau (flèche jaune fine) dans la cellule. La vacuole gonfle grâce à l'entrée de solutés et d'eau (flèche jaune épaisse). En même temps, l'acidification de l'apoplasme active un certain nombre de protéines impliquées dans le relâchement de la paroi : les expansines (EXP), xyloglucane endotransglucosylase/hydrolase (XTH), pectines méthylestérases (PME), PG, pectine-lyases (PL) et les pectine-acétylestérases (PAE). Ces protéines vont permettre de rompre les liens entre les différents polysaccharides de la paroi : cellulose (fibrilles jaune), pectines (vert) et xyloglucanes (rouge). D'après Majda et Robert, 2018.

La perception de l'auxine dans l'hypocotyle se fait par le biais des corécepteurs nucléaires d'auxine TIR1/AFP et Aux/IAA et induit l'expression de SAUR19 une protéine inhibitrice des phosphatases appartenant à la famille PP2C (Fendrych et al., 2016). L'inhibition des PP2C conduit à la phosphorylation de l'avant dernier résidu Thréonine du domaine

d'inhibition des pompes à protons membranaires d'Arabidospsis H^+-ATPases (AHAs) et conduit à leur activation (Takahashi et al., 2012 ; Spartz et al., 2014). A plus long terme, l'application d'auxine exogène sur des plantules d'Arabidopsis conduit à un différentiel d'expression pour 790 gènes (Nemhauser et al., 2006). Parmi les gènes surexprimés, on retrouve des gènes impliqués dans la composition de la paroi primaire et certains appartiennent à des familles de gènes impliquées dans l'élongation cellulaire : expansines 4 et 11 et PME1 et 34 par exemple (Nemhauser et al., 2006). Aussi, dans l'hypocotyle d'Arabidopsis, il a récemment été décrit que l'auxine induit une moindre complexité d'organisation des xyloglucanes dans la paroi ce qui favorise la croissance (Velasquez et al., 2021).

Dans la racine, le rôle de l'auxine semble plus complexe et dépendant de sa concentration locale et du type cellulaire étudié. De plus, il existe deux isoformes prédominantes d'H^+-ATPases, AHA1 et AHA2 (Baxter et al., 2003) avec un rôle majeur d'AHA2 dans l'excrétion des protons comme démontré par une approche génétique (Haruta et al., 2010). La distribution de l'auxine dans la racine dépend des transporteurs PINs qui assurent son efflux polarisé, de la synthèse et dégradation locale de l'auxine ainsi que de sa signalisation. Le faible niveau d'auxine au niveau de la zone de transition agit comme un signal afin de déclencher la différenciation cellulaire (Di Mambro et al., 2017). Dans les cellules épidermales de la ZT de la racine primaire, l'auxine induit une réponse de pH apoplasmique bi phasique commençant par une alcalinisation rapide suivie quelques heures plus tard d'une acidification qui sont respectivement associé à une diminution et une augmentation de l'élongation cellulaire (Barbez et al., 2017). Dans la racine de *Brachipodium distachyon,* le fort niveau d'auxine endogène du mutant (ein2l1 hypo) est associé à une moindre excrétion des protons (Pacheco-Villalobos et al., 2016) alors que chez Arabidopsis, l'application d'auxine IAA à faible concentration (10pM) induit l'élongation de la racine primaire (Evans et al., 1994).

D'autres phytohormones sont connues pour réguler l'activité des AHA1 et 2 et notamment les cytokinines qui ont un effet activateur et créent un environnement favorable à l'activité des protéines pariétales impliquées dans le relâchement de la paroi (Pacifici et al., 2015). Quant à l'éthylène, l'application d'un de ses précurseurs l'ACC provoque un arrêt de l'élongation des cellules racinaires (Verbelen, 2006).

L'activation des AHAs induit une hyperpolarisation de la membrane, ce qui va activer les canaux potassiques entrant sensibles au voltage (Figure I.6) (Dietrich et al., 2001 ; Kim et al., 2010). L'entrée massive de K^+, osmoticum majoritaire, entraine un influx d'eau qui va gonfler la vacuole et générer une pression de turgescence. De plus, la concentration

cytoplasmique en K^+ est élevée, 100mM, et supérieure à celle retrouvée dans le milieu externe. Ainsi, pour faire rentrer le K^+ contre son gradient de concentration, l'activité des AHAs est essentielle pour fournir l'énergie nécessaire au fonctionnement des nombreux transporteurs présents à la MP. Dans les cellules racinaires, l'influx de K^+ est majoritairement assuré par l'activité de canaux potassiques entrant de type Shaker : AKT1 en condition de forte et moyenne concentration externe en K^+ et HAK5 en condition de faible concentration externe en K^+ (Nieves-Cordones et al., 2014). Quand ils sont respectivement mutés, la croissance de la racine primaire est négativement impactée (Hirsch et al., 1998 ; Pyo et al., 2010). L'entrée de K^+ dans la cellule va diriger les flux d'eau qui sont conduits par les aquaporines. En particulier, l'expression de l'aquaporine tonoplastique γ-TIP démarre brutalement à la fin de la ZT et participe à la turgescence de la vacuole (Ludevid et al., 1992).

Dans le raisin, les flux de K^+ sont majoritairement conduits par des canaux de type Shaker qui sont présents à la MP des cellules du phloème et des cellules de la pulpe. L'activité des canaux Shaker est dépendante du voltage et souvent régulée par le pH (Cuellar et al., 2013 ; Nieves-Cordones et al., 2018 ; Villette et al., 2019). Quant aux flux d'eau et de sucres ils sont respectivement assurés par des aquaporines membranaires VvPIP1A, VvPIP2 ;1 et tonoplastiques VvTIP2 ;1 et des transporteurs de saccharose et d'hexoses (Picaud et al., 2003 ; Fouquet et al., 2008 ; Lecourieux et al., 2013). Couplés au relâchement de la paroi, les flux d'eau et de solutés entraînent une reprise de la croissance de la baie qui était en latence à la véraison et conduit à l'expansion des cellules du mésocarpe qui peuvent atteindre une taille allant jusqu'à 400µm (Nunan et al., 1998 ; Ojeda *et al*., 1999).

L'activation des AHAs conduit à une acidification de l'apoplasme et à l'activation de protéines pariétales impliquées dans le relâchement de la paroi (Cosgrove, 2015) (Figure I.6). Dans la racine d'Arabidopsis, la chute du pH apoplasmique (pH5,4) au niveau de la zone de transition coïncide avec le début de l'élongation rapide des cellules (Staal et al., 2011). Dans les zones de transition et d'élongation, sont exprimées de nombreuses protéines pariétales qui participent au relâchement de la paroi pecto-cellulosique et dont l'activité est promue dans un environnement acide. En particulier, les expansines, protéines pariétales non enzymatiques dont l'activité est optimale à pH 4,5 (Cosgrove et al., 2015) vont couper les liaisons entre les microfibrilles de cellulose et les xyloglucanes ce qui permet un relâchement du maillage de la paroi. Dans la ZT de la racine, de nombreuses expansines sont exprimées et notamment EXPA1 dont l'activité semble essentielle pour contrôler la position de la ZT et l'expansion des cellules (Pacifici et al., 2018). Par ailleurs, l'acidification de l'apoplasme active également les XTHs,

fortement exprimées dans la ZT, qui participent au clivage des composants de la paroi ou les PMEs qui déméthylent les pectines les rendant accessibles à la dégradation par des PGs et PLs et conduisant à un relâchement de la paroi. La composition de la paroi de la partie proximale de la ZT est ainsi modifiée pour permettre une élongation rapide des cellules et on y retrouve une plus grande proportion de (1→ 4)-β-D-Galactan, de cellulose, de xyloglucanes et de pectines méthylestérifiées (Verbelen et al., 2006). De plus, l'état de méthylestérification des pectines semble également jouer un rôle dans la croissance comme illustré avec les mutants pme17-1, pme17-2 et sbt3.5 (subtilysine type sérine impliquée dans la maturation des PMEs) qui présentent une activité PME totale fortement réduite et associée à un changement de l'état de méthylesterification des pectines et à une croissance plus importante (Sénéchal et al., 2014). De même, la surexpression d'AtPMEI-1 et 2 conduit à une augmentation du degré de méthylestérification de 16% et est associée à une augmentation de la croissance racinaire (Lionetti et al., 2007).

Dans le raisin, à partir de la véraison, stade développemental à partir duquel la croissance du fruit se fait uniquement par le biais de l'expansion cellulaire, le pH de la baie augmente mais se maintient à une valeur acide : pH3,5 (Terrier et al., 2001). L'expansion des cellules de la baie est associée à une expression croissante des gènes codant pour les protéines pariétales VvEXPA1, 2 et 3. De plus, l'activité de VvEXPA1 est régulée par VvCEB1, un facteur de transcription impliqué dans la régulation de la taille des cellules et donc l'expression est maximale au cours de la maturation (Nicolas et al., 2013).

Par ailleurs, un assouplissement de la baie est observé en lien avec des modifications structurales de la paroi des cellules du mésocarpe et notamment une diminution de la concentration des pectines (Odeja et al., 1999). Aussi, lorsque la baie progresse dans la maturité, une diminution du degré de méthylestérification des pectines de l'ordre de 5 à 20% et observée dans les cellules de la pellicule de nombreux cépages (Cabernet Sauvignon, Merlot, Monastrell et Syrah) et des cellules de la pulpe (Ortega-Regules et al., 2007 ; Nunan et al., 1998). Les PME sont impliquées dans le murissement des fruits, leur activité permet aux PGs d'entrer en action, d'hydrolyser et dépolymériser les pectines ce qui conduit à une perte de la cohésion cellulaire et in fine une perte de la fermeté des fruits (Wakabayashi et al., 2003). Dans le raisin, à partir de la véraison, une expression accrue d'un gène codant pour une PME, VvPME1 (AF159122) est observée. L'activité de cette PME augmente le taux de pectines déméthylées et fournit un substrat aux PGs qui dépolymérisent les pectines induisant un relâchement de la paroi et contribue à une perte de fermeté de la baie (Barnavon et al., 2001).

2. Contrôle de l'élongation cellulaire

L'association de la pression de turgescence et le relâchement de la paroi conduisent à un allongement de la cellule. Une autre des conséquences du relâchement de la paroi est l'éloignement des microfibrilles de celluloses qui laisse place à l'incorporation de nouveaux composants apportés à la paroi par exocytose. L'incorporation de nouveau matériel dans la paroi permet d'augmenter sa surface. L'élongation de la paroi entraine un étirement de la membrane plasmique et l'ouverture de canaux calciques membranaires mécano sensibles conduisant à un influx de Ca^{2+} (Figure I.7) (Monshausen et al., 2009). L'accumulation de Ca^{2+} dans le cytosol conduit à une inhibition des H^+-ATPases et a une alcalinisation de l'apoplasme, ce qui inactive les protéines impliquées dans le relâchement de la paroi (Monshausen et al., 2009). De plus, l'alcalinisation de l'apoplasme active la NADPH-oxydase membranaire. L'activation de cette enzyme relargue des ions superoxyde dans l'apoplasme qui sont convertis en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). L'H_2O_2 va favoriser de nouvelles liaisons entre les composants de la paroi et entrainer une déshydratation et une rigidification de la paroi (Wolf et al., 2012).

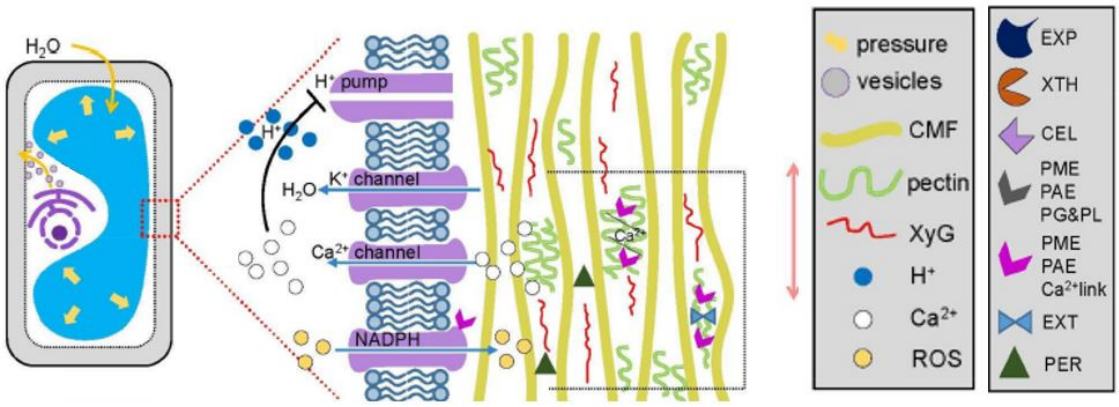


Figure I.7 : L'élongation d'une cellule de racine - deuxième étape : le relâchement de la paroi et la turgescence permettent l'élongation de la cellule. L'augmentation de la porosité pariétale laisse la place à l'ajout de nouveaux polysaccharides. Le relâchement de la paroi active des canaux calciques et entraine un efflux de calcium dans la cellule. L'influx de Ca^{2+} va inhiber les H^+-ATPases et alcaliniser l'apoplasme ce qui stoppe l'expansion cellulaire. D'après Majda et Robert, 2018.

Les processus d'élongation sont extrêmement dynamiques et oscillent entre élongation rapide et ralentissement de la croissance. Ce phénomène est bien décrit dans les poils racinaires et le tube pollinique et serait associé à des oscillations de Ca2+, de pH apoplasmique/cytoplasmique

et de ROS (espèces réactives de l'oxygène) (Rounds et al., 2011 Càrdenas et al., 2008 ; Monshausen et al., 2007 ; Schoenaers et al., 2018).

Les H^+-ATPase sont aussi la cible de mécanismes de régulation complexes faisant intervenir des peptides sécrétés comme les Rapid Alkalinization Factor (RALF). Dans la racine d'Arabidopsis, l'interaction entre le récepteur kinase membranaire FERONIA et certains RALF est connu pour jouer un rôle dans la détection des contraintes mécaniques de la paroi (Voxeur et Hofte, 2016). L'interaction entre RALF et FERONIA entraine un flux de Ca^{2+} dans le cytosol et la phosphorylation de l'AHA2 au niveau de la Ser899 ce qui inhibe son activité et entraine une alcalinisation de du pH apoplasmique (Figure I.8) (Haruta et al., 2014). Gjetting et al., ont identifié une interaction entre RALF33 et FERONIA conduisant une signalisation calcique cytoplasmique avec pour conséquence une inhibition de l'AHA2 et une alcalinisation du pH apoplasmique (Gjetting et al., 2020). RALF36 produit le même effet en se liant à un récepteur kinase de la famille *Catharanthus roseus* receptor-like kinase like CrRLK1L avec pour conséquence une inhibition de la croissance de la racine primaire d'Arabidopsis. PSY1 est un peptide sécrété qui promeut la croissance cellulaire via acidification du pH apoplasmique (Fulsgang et al., 2014). De façon surprenante, l'application de PSY1 exogène conduit à son interaction avec le récepteur PSY1R et a pour effet de stimuler l'expression des gènes codant pour RALF33 et RALF36 (Figure I.8) (Gjetting et al., 2020).

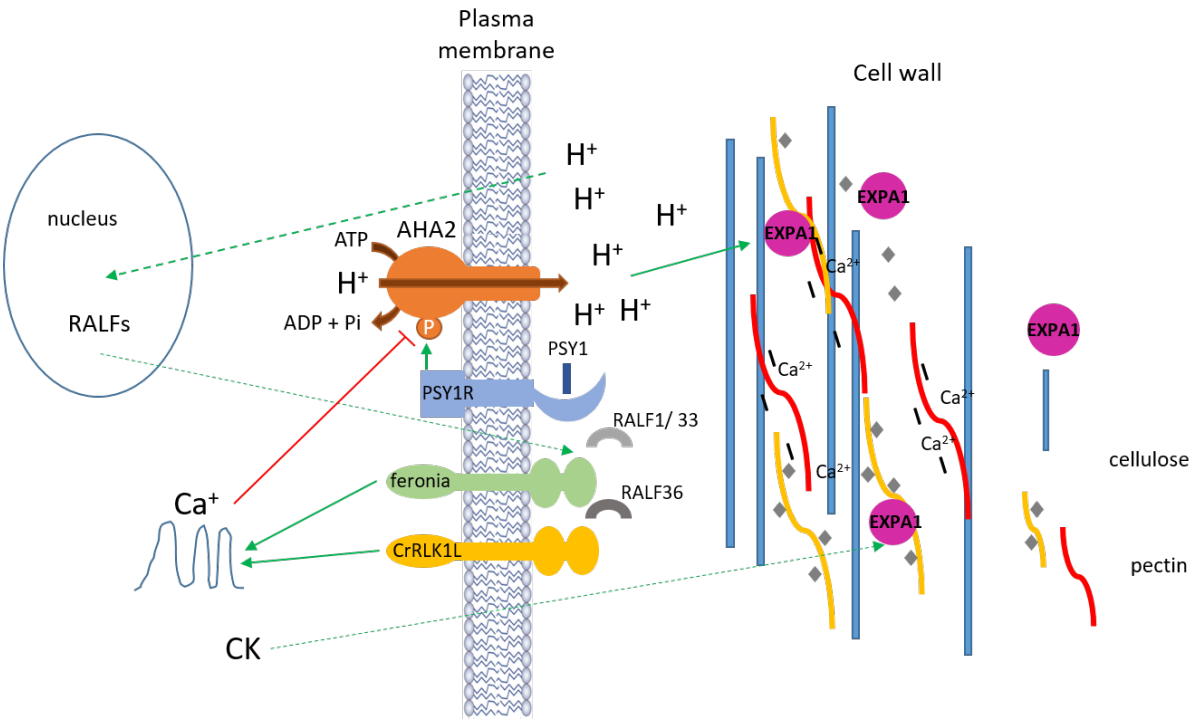


Figure I.8 : Régulation de l'activité de l'AHA2 par les peptides sécrétés RALF et PSY1. La liaison de PSY1 avec son récepteur PSY1R entraine une activation de l'H^+-ATPase AHA2 qui acidifie l'espace apoplasmique. Cette acidification a un effet activateur sur l'expression des gènes codant pour les peptides RALFs. L'interaction des peptides d'alcalinisation RALF avec leurs récepteurs kinases FERONIA et CrRLK1L entraine une vague de calcium cytosolique qui conduit à la phosphorylation de l'AHA2 et à son inhibition. L'inhibition de l'AHA2 entraine une alcalinisation du pH apoplasmique, inhibe l'activité des protéines impliquées dans le relâchement (EXPANSINE1 en violet) de la paroi et stoppe l'élongation de la cellule. D'après Gjetting et al., 2020.

En ce qui concerne la vigne, les H^+-ATPases à la membrane plasmique n'ont pas fait l'objet d'étude approfondie et seule l'activité des vATPase et vPPase tonoplastiques a été étudiée au cours du développement de la baie (Terrier et al., 2001). Aussi, 4 peptides RALFs ont été identifiés chez la vigne (Campbell et al., 2017) dont 3 sont exprimés dans les raisins. Un 5ème RALF a été identifié et est aussi exprimé dans le raisin (donnée d'Isabelle Cherel non publiée). L'application de calcium exogène sur des raisins de table appartenant aux cépages Italia et Crimson à différents stades de développement a pour effet d'augmenter respectivement le poids de la grappe et la taille des raisins (Ciccarese et al., 2013 ; Alcaraz-Lopez et al., 2005). Néanmoins les mécanismes moléculaires impliqués sont inconnus à ce jour.

V. Les outils fluorescents permettant de réaliser des mesures de pH dans l'apoplasme

Le pH est un paramètre clé impliqué dans de nombreux processus physiologiques tels que la nutrition, la réponse aux pathogènes ou la croissance. Du fait de son rôle primordial, de nombreux outils ont été développés pour permettre son étude *in vivo*. La majorité des outils permettant de réaliser des mesures de pH *in vivo* ont été développés dans un premier temps sur cellules animales et adaptés aux cellules végétales. Cette partie résume de façon non exhaustive les outils disponibles, leurs propriétés et leurs avantages et inconvénients. Plus de détails seront disponibles dans le chapitre 2 qui présente un état des lieux des outils fluorescents permettant de réaliser des mesures de pH *in vivo* dans la racine primaire d'Arabidopsis dans le contexte de l'élongation des cellules.

1. Les microélectrodes à H^+

Historiquement, les premières mesures de pH ont été réalisées avec des microélectrodes en verre à H^+. Développées dans les années 70, elles ont permis de réaliser de

nombreuses études des flux de protons au travers de la membrane plasmique chez diverses espèces comme Arabidopis ou le maïs (Staal et al., 2001 ; Peters et al., 1999). Positionnées à la surface des tissus, elles permettent d'enregistrer une différence de potentiel électrique entre la pointe de l'électrode et une référence externe (autre électrode positionnée dans le milieu extérieur) (Miller, 2001). Elles permettent de réaliser des mesures de pH dans la totalité de la gamme de valeurs de pH existant *in vivo* et les mesures réalisées sont considérées comme étant fiables et reproductibles (Felle 1998). En revanche, la résolution spatiale est faible et ne concerne que l'environnement au contact direct de la microélectrode. De plus, il est techniquement difficile de positionner la micro électrode dans le bon compartiment cellulaire et sans endommager la cellule. Plus adapté aux cellules isolées, cet outil a par exemple permis de mettre en évidence l'existence d'oscillations de pH et d'espèces réactives de l'oxygène en lien avec la croissance du poil racinaire (Monshausen et al., 2007).

2. Les outils fluorescents

Une autre approche pour mesurer le pH se base sur les propriétés de fluorescence de sondes chimiques et de senseurs génétiquement encodés et fait appel à la microscopie à fluorescence. Les propriétés de fluorescence des sondes varient en fonction de l'environnement dans lequel elles se trouvent et permettent d'étudier de nombreux paramètres de la cellule : concentration ioniques, statut redox et le pH par exemple.

Les sondes et biosenseurs fluorescentes ratiométriques permettent de mesurer le pH grâce à leur particularité spectrale. En résumé, ces outils présentent des différences de sensibilité au pH selon la longueur d'onde d'excitation. En utilisant deux longueurs d'onde d'excitation sur le spectre, une avec une forte et l'autre avec une faible sensibilité au pH, on obtient un ratio de fluorescence qui renseigne sur le pH environnant. Une fois calibré, ce ratio permet de quantifier le pH (Swanson et al., 2011). Une seule molécule fluorescente sensible au pH peut être utilisée si elle présente une double excitation comme l'Oregon Green ou la pHluorine (Fasano et al., 2001 ; Martinière et al., 2018) ou en association avec une autre molécule fluorescente présentant des différences de sensibilité au pH comme la combinaison Cl-NERF-dextran et Texas Red-Dextran (Bibikova et al., 1998) ou le biosenseur pHusion, tandem composé de la mRFP1 et de la GFP (Gjetting et al., 2012).

L'utilisation des sondes fluorescentes est relativement simple, peu couteuse et permet d'obtenir des informations de pH avec une forte résolution spatio-temporelle. Néanmoins, elles présentent un désavantage qui est la difficulté à pénétrer dans les tissus ce qui génère du stress

cellulaire à cause de la pression appliquée pour les infiltrer (Yu et al., 2000) et un marquage limité en surface (Barbez et al., 2017). De plus, lorsqu'elles sont utilisées pour des mesures de pH apoplasmiques dans des types cellulaires ne possédant pas de cuticule, les sondes diffusent hors des tissus (Bibikova et al., 1998). Pour pallier à ce problème, il est possible de les fusionner à la paroi comme réalisé par Fasano et al., avec une fusion Oregon Green + domaine de liaison à la cellulose provenant de la cellulase de *Clostridium cellulvarans* (Fasano et al., 2001).

Les senseurs génétiquement encodés sont de puissants outils exprimés par les cellules qui permettent d'explorer des processus biologiques *in vivo*. Ils sont généralement constitués d'une ou deux protéines fluorescentes fusionnée(s) à un peptide signal, un domaine transmembranaire ou une protéine de localisation déterminée pour les adresser dans un compartiment subcellulaire précis (Gjetting et al., 2012 ; Martinière et al., 2013 et 2018 ; Kesten et al., 2019). Le fait d'ancrer un biosenseur apoplasmique à la membrane plasmique permet de s'affranchir du problème de diffusion hors des tissus (Martinière et al., 2018 ; Kesten et al., 2019). L'utilisation de biosenseurs de pH encodés génétiquement couplée à l'avancée des techniques de microscopie offre l'opportunité de réaliser des acquisitions d'une importante résolution spatiotemporelle permettant d'étudier les dynamiques de pH *in vivo* à l'échelle d'un compartiment subcellulaire. En revanche, leur utilisation est restreinte aux organismes transformables et nécessite un temps long pour générer les lignées de plantes les exprimant stablement.

Cependant quel que soit les outils fluorescents, ils présentent un inconvénient majeur, à savoir qu'ils sont majoritairement éteints dans la gamme des pH inférieurs à 5 rendant inaccessible les mesures dans un environnement très acide. De plus, ces outils peuvent présenter une sensibilité à leur environnement ionique et redox et nécessitent d'être intensivement caractérisés *in vitro* et *in vivo* pour étudier la sensibilité de leurs spectres de fluorescence à d'autres paramètre physicochimiques que le pH.

Plan des chapitres composant ce manuscrit :

Le premier chapitre de ma thèse est composé d'une revue intitulée « pH biosensing in the plant apoplast—a focus on root cell elongation » et publiée dans le journal « Plant Physiology ». Ce premier chapitre décrit les outils fluorescents à disposition de la communauté scientifique permettant la mesure de pH apoplasmique dans la racine dans le contexte de l'élongation des cellules de la racine primaire.

Le deuxième chapitre est constitué d'un article de recherche intitulé « Genetically encoded fluorescent sensors adapted to acidic pH highlight subdomains within the plant cell apoplast » soumis à « Journal of Experimental Botany » et en cours de révision. Ce travail expose le développement et la caractérisation de nouveaux biosenseurs de pH génétiquement encodés : les Acidines qui sont adaptées à un environnement acide. Leur expression transitoire en épiderme de tabac révèle une forte hétérogénéité de pH dans l'apoplasme ainsi qu'une contrainte de diffusion qui limite l'accessibilité du senseur dans certaines régions l'espace apoplasmique.

Le troisième chapitre traite du développement de senseurs de pH associés à la paroi pectinique et leur caractérisation. Ces senseurs pariétaux étendent la couverture de l'espace apoplasmique et interrogent sur le lien entre le degré de méthylestérification et le pH apoplasmique en lien avec l'expansion des cellules de la racine primaire d'Arabidopsis.

Un quatrième et dernier chapitre présente les résultats obtenus sur le modèle raisin et l'évolution du pH vacuolaire des cellules de la pulpe au cours du développement de la baie.

Enfin, une conclusion générale reprend les différents éléments exposés dans chaque chapitre et présente des perspectives que ce travail offre.

Matériel et méthode

Matériel et méthode

I. Matériel végétal et conditions de culture

1. *Arabidopsis thaliana*

Les plantes d'Arabidopsis thaliana que j'ai utilisées pendant ma thèse pour générer des lignées exprimant les senseurs de pH appartiennent à l'écotype Columbia 8 (Col 8). Le mutant pme17-1 (FLAG208G03) knock-out (KO) pour le gène pme17 (AT2G45220) écotype Wassilewskija (Ws) a été isolé à partir de la banque de mutants FLAG (INRAE, Versailles, France). Il présente une insertion d'ADN-T au niveau du premier exon. La lignée transgénique KO pme17-1 et le sur-expresseur PME17OX (Sénéchal et al., 2014) ont été fournis par Samantha Vernhettes (IJPB, Versailles). Le mutant KO aha2.4 (SALK_082786) présente une insertion d'ADN-T au niveau d'un intron du gène aha2 (AT4G30190) (Haruta et al., 2010). Enfin, le double mutant cgr2/3 présentant une insertion d'ADN-T en amont du codon start pour cgr3 (AT5G65810) et dans le 5ème exon pour cgr2 (AT3G49720) ainsi que les sur-expresseurs CRG2OX et CGR3OX (écotype Col 0) (Kim et al., 2015) ont été fournis par Federica Brandizzi.

Pour la culture *in vitro*, les graines d'Arabidopsis thaliana sont décontaminées avec une solution contenant 0,5% de Barychlore et 0,02% de détergent Tween20 puis semées par capillarité sur une boite de Pétri contenant du milieu MS/2, 2,5mM MES-KOH (pH6), 1% sucrose et 0,8% d'agar type E (Sigma) sous une hotte à flux laminaire. Les références des produits entrant dans la composition des milieux de cultures sont listées dans l'annexe 1.

La culture *in vitro* des plantules d'Arabidopsis est réalisée en jour long (6h-22h) avec une intensité lumineuse de 150µM/m^2/s. La température y est de 22°C le jour et 20°C la nuit et l'humidité relative est de 65%. Par la suite, elles sont soit transférées sur un nouveau milieu pour l'observation au microscope (cf matériel et méthode du chapitre 2), soit transférées en serre S2 pour amplification en pot individuel contenant du terreau universel préalablement congelé à -20°C pour limiter le développement de mouches de terreau. Les pots sont disposés sur un plateau souple et arrosées deux fois par semaine par sub-irrigation. Environ deux fois par cycle, les plantes sont traitées avec une solution de VectoBac (2mL/ L, 515100 WG) et d'engrais enrichi en azote, phosphate et potassium. Les graines sont récoltées en fin de cycle lorsque les siliques sont sèches.

2. Tabac (*Nicotiana tabacum*)

Les tabacs utilisés appartiennent à l'espèce *tabacum*. Ils sont cultivés dans une chambre de culture en jour court (9h-17h) d'une intensité lumineuse de 120µM/m2/s avec des températures de 25°C le jour et 20°C la nuit et une humidité relative de 65%.

3. La vigne (*Vitis vinifera*)

Les vignes du cépage grenache (*Vitis vinifera* cv. Grenache) de 3 ans, clone 362, sont greffés sur un porte greffe 110 Richter (110R). Les vignes ont été cultivées sur le vignoble de Supagro dans des pots de 3 litres sous irrigation contrôlée (système de goutte à goutte) avec une solution nutritive composée de 2,2% d'azote, 1,6% de phosphate, 6,4% de potassium ainsi que 1,6% d'oxyde de magnésium et de micro-éléments (Liquoplant FD11 hiver). Une fois arrivées au stade de développement de fermeture des grappes (lorsque les raisins entrent en contact du fait de leur expansion), les vignes sont transférées en serre S2. Le compartiment dans lequel elles sont placées possède les caractéristiques suivantes : la photopériode n'est pas contrôlée et la température est maintenue à des valeurs entre 20 et 27°C. Les pots sont pesés chaque jour pour estimer la perte en eau et les vignes sont arrosées avec la même solution nutritive que celle utilisée sur le vignoble.

II. Transformation du matériel végétal et caractérisation

1. Transformation stable d'*Arabidopsis thaliana*

Les plantes d'Arabidopsis sont transformées par la méthode de « trempage des fleurs » (Clough and Bent, 1998). Idéalement, les plantes à transformer doivent être âgées de 4 à 5 semaines et présenter de longues hampes florales possédant de jeunes fleurs. Les hampes florales sont trempées deux fois une minute dans la solution de transformation (EHA105 contenant la construction à intégrer dans le génome + saccharose 5% + silwet 0,02%). Un sac en plastique est positionné sur les plantes pendant 48h afin de maintenir un environnement humide favorable à la transformation. 4 semaines après environ, les graines sont prêtes à être récoltées.

2. Transformation transitoire de tabac

La transformation se fait sur des plants de tabac *Nicotiana tabacum* âgés de deux mois environ. Les feuilles de tabac sont blessées mécaniquement avec un cône 10µL et la solution de transformation (EHA105 à une DO_{600} de 0,1 dans du MES 50mM pH 5,6, Na_3PO_4 2mM, d'actétosyringone 100µM et du glucose 0,5%) est infiltrée au niveau de la face adaxiale de la

feuille grâce à une seringue de 1ml placée au niveau de la blessure. Les plantes sont remises en chambre de culture et observées en microscopie 72h après infiltration.

3. Transformation transitoire de baies de raisin

Ce protocole de transformation transitoire de raisin a été mis au point par Fatma et David Lecourieux (UMR EGFV, Villenave d'Ornon) à partir d'un protocole de transformation par agrobactéries adapté aux fruits charnus (Spolaore et al., 2001).

Les baies sont transformées très précisément 15j avant véraison avec des agrobactéries EHA105 qui possèdent un important niveau de virulence nécessaire à une transformation efficace des cellules. 24h avant transformation, une pré-culture de 2mL d'agrobactéries EHA105 contenant la construction d'intérêt est incubée pour la nuit à 30°C à 210 rpm dans de milieu de culture YEB pH7,2 supplémenté de Rifampycine 50mg/L et d'antibiotique de sélection du plasmide. Le jour de la transformation, 10ml de YEB + 100mM MES (pH 5,6) + actérosyringone 20µM sont ensemencés avec la pré-culture à une DO_{600} de 0,4 et incubés à 30°C 210rpm jusqu'à ce que la DO_{600} atteigne 0,8. Puis, les agrobactéries sont centrifugées 10min à 5000rpm et re-suspendues dans 2 mL de milieu MMA (MS salt, MES 100mM pH 5,6 et acétosyringone 20µM) et à nouveau centrifugées 10 min à 5000rpm. Finalement, les agrobactéries sont resuspendues dans du milieu MMA à une DO_{600} finale de 2,4, et incubées pendant au moins 1h à 22°C avec agitation douce juste avant l'infiltration. Au total, 3 infiltrations d'environ 50µl seront réalisées à 24h d'intervalle pour chaque baie individuellement à l'aide d'une seringue 1 mL et d'une aiguille hypodermique ultrafine (30GA1/2 0,3x13). La première injection se fait dans la baie à l'opposé du pédicelle (Figure 1). Les deuxièmes et troisièmes injections sont réalisées dans le pédicelle ou légèrement vers le pinceau. L'observation des baies est réalisée à partir d'une semaine post transformation.

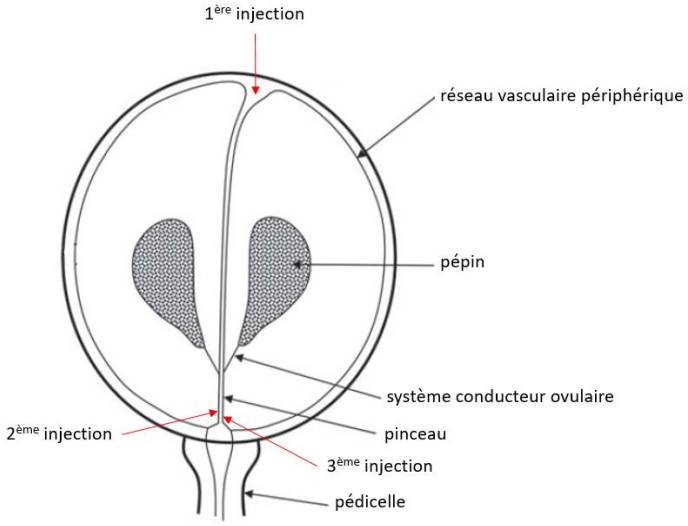


Figure 1 : Coupe longitudinale d'une baie de raisin. Les trois sites d'injection sont indiqués par une flèche rouge. D'après Chatelet et al., 2008.

III. Biologie moléculaire

1. Souche et origine du matériel utilisé

Les plasmides utilisés lors de mon travail de thèse sont listés dans le tableau 1 et les souches de bactéries Escherichia coli (E.coli) et d'agrobactéries utilisées sont listées dans le tableau 2. Les agrobactéries sont sélectionnées avec l'antibiotique rifampicine (Euromedex 1059-5) et l'antibiotique correspondant à la résistance portée par le vecteur. Enfin, l'origine des protéines fluorescentes ayant servies à générer les senseurs de pH et les protéines pariétales utilisées pour adresser les senseurs de pH dans la paroi sont listées dans le tableau 3.

Nom du vecteur	Caractéristiques et utilisation	Antibiotique
pUPD2	Vecteur d'entrée Golden Braid	Chloramphénicol 50mg/L (Acros Organics 227920250)
pDGB3α1 (pGreen)	Vecteur binaire Golden Braid utilisé pour expression transitoire en tabac	Kanamycine 50mg/L (Euromedex UK0010-D)
pDGB3Ω1R (proCambia)	Vecteur binaire Golden Braid pour transformation stable en Arabidopsis	Spectinomycine 50mg/L (Biobasic SB0901)
pRsetB	Etiquette 6xHis clivable en N-terminal (Invitrogen) Surproduction de protéines en bactéries	Ampiciline 50mg/L (Sigma A9518)

Tableau 1 : Détail des vecteurs utilisés.

Souche de bactéries	Utilisation
E.Coli DH5α ou Top10	Souches utilisées pour l'amplification des constructions
Agrobactéries EHA105 électocompétentes	Agrobactéries utilisées pour la transformation des plantes. Sélection sur Rifampycine 50mg/L (Euromedex 1059-5)
E.Coli BL21 PLYS S thermocompétentes	Souche utilisée pour la sur-production de.protéines en bactérie. Sélection sur chloramphénicol 25mg/L (Acros Organics 227920250)

Tableau 2 : Liste des souches de bactéries utilisées.

Nom	Origine et descriptif
mRFP1	Campbell et al., 2002 composant des senseurs de pH acidine2, 3 et 4
TagBFP2	Synthétisée par GeneCust à partir de la séquence publiée dans Subach et al., 2011 en optimisant les codons pour E coli et plantes. Composant du senseur de pH acidin2
SYFP2	Kremers et al., 2006. Composant du senseur acidine4
Gamillus	Shinoda et al., 2018. Composant du senseur acidine3
pHluorine	Composant des senseurs de pH publiés dans Martinière et al., 2018
LuPME1	Al-Qsous et al., 2004. Pectine methyl estérase de lin de type 1
AT5G11420	Stoddart et Rolland, 2019. Protéine pariétale de fonction inconnue.

Tableau 3 : Origine des différentes protéines utilisées.

2. Clonage moléculaire

- Par la technique du GoldenBraid (https://gbcloning.upv.es/):

La plupart des constructions ont été obtenues par la technique du GoldenBraid (GB) (Sarrion-Perdigones et al., 2013) qui s'appuie sur des cycles de clivage par des enzymes de restriction de type IIS et de ligation. Elle permet d'assembler les fragments d'ADN dans un ordre précis selon les règles de la grammaire GB. Les vecteurs utilisés sont mentionnés dans le tableau 1.

- Par site de restriction :

Les constructions nécessaires pour la production de protéines en bactéries ont été obtenues par la technique de restriction/ ligation à l'aide de la T4 ligase (M180A, Promega) selon les instructions du fabricant.

Les constructions seront détaillées dans les chapitres correspondants : chapitre 3 pour les senseurs de pH adaptés au pH acide, les acidines et chapitre 4 pour les senseurs de pH pariétaux.

IV. Caractérisation du matériel obtenu

1. Génotypage des mutants et surexpresseurs d'Arabidopsis

L'extraction d'ADN génomique d'Arabidopsis thaliana a été réalisée avec le protocole d'extraction au cétyltriméthylammonium bromure (CTAB) (Wagner et al., 1987). Afin de valider la présence de l'ADN-T dans le génome des mutants KO et la présence d'un promoteur p35S dans les fonds surexpresseurs, des réactions de polymérisation en chaine (PCR) sont réalisées avec la GoTaq DNA polymerase (Promega, M830A) selon les instructions du fabricant. Les amorces utilisées sont listées dans l'annexe 2.

2. Phénotypage des lignées Arabidopsis

Les plantules d'Arabidopsis exprimant le senseur fluorescent d'intérêt sont criblées lorsqu'elles ont moins d'une semaine sur la seule base de leur fluorescence à l'aide d'un macroscope Axiozoom V16 de Zeiss. La sélection se fait sans antibiotique pour éviter l'auto fluorescence liée au stress. Par la suite, les plantules présélectionnées sont observées en détail grâce au microscope inversé à épi fluorescence observer 7 ApoTome de Zeiss.

3. SDS-Page et analyse des profils protéiques

La présence et la taille des protéines d'intérêt a été contrôlée par électrophorèse en gel SDS PAGE (Laemli), marqueur de poids moléculaire (Dual color portein standard III, Serva suivi d'un Western blot comme indiqué dans le matériel et méthodes du chapitre 2. La pHluorin est détectée par des anticorps primaires anti GFP (1/2000, A6455 molecular probes) et d'anticorps secondaire anti lapin (1/2000, 172-1019 Biorad). La RFP est détectée par des anticorps monoclonaux anti RFP (1/2000, 6G6, Chromotek) et des anticorps secondaires anti souris (1/2000, 170-6516 Biorad).

V. Calibration et mesures de pH

1. Production de senseur de pH en bactéries

Les senseurs de pH ont été produits à l'aide de bactéries E.Coli souche BL21 pLys S thermocompétentes. La production a été obtenue en suivant les recommandations du fabricant (Invitrogen) et optimisée en regroupant 5 cultures d'un petit volume (5mL) en remplacement d'une culture de 25mL. Les protéines produites sont purifiées sur colonne de nickel selon les

instructions du fabricant (ProBond Resin Invitrogen). Environ 500 µl de protéines purifiées et concentrées sont produits. Du glycérol et du DTT sont ajoutés à 10% et 1mM final, respectivement, puis la protéine est aliquotée par fraction de 10µl et congelée à l'azote liquide. Les aliquots sont conservés à -20°C et sont utilisés pour réaliser les gammes de calibration *in situ* à chaque session de microscopie confocale ou *in vitro* pour l'analyse poussée des propriétés de fluorescence du senseur à l'aide d'un spectrofluorimètre Xenius SAFA. Voir matériel et méthode du chapitre 3 pour plus de détails.

2. Calibration pour mesure de pH

Trois types de calibration ont été utilisés pour obtenir des valeurs de pH à partir des informations de fluorescence du matériel végétal : *in situ, in vitro* et *in vivo*. La calibration *in situ* est réalisée à l'aide du microscope inversé confocal Leica SP8. Elle consiste à diluer le senseur purifié produit en bactérie (au 1/0 ou au 1/20) dans une gamme de tampon de pH défini (cf composition en annexe 3), à déposer une goutte de dilution sur une lamelle et à prendre 5 images fluorescentes de ces gouttes sur 5 plans focaux aux mêmes réglages et le même jour que l'acquisition d'images sur du matériel végétal. La calibration *in vitro* est réalisée avec un spectrofluorimètre Xenius (SAFA) en diluant le senseur fluorescent purifié produit en bactérie dans divers tampons de composition décrite en annexe 3. Cette technique permet d'obtenir des spectres d'émission et d'excitation des senseurs dans des conditions ionique et redox contrôlées (cf chapitre 3 pour plus de détail). La calibration *in vivo* est réalisée avec un microscope ratiométrique inversé à épifluorescence Zeiss Axiovert 200M. Elle consiste à imposer un pH à l'échantillon végétal et à collecter le ratio de fluorescence en temps réel (voir annexe 4 pour la composition des tampons). Les ratios de référence pour un pH imposé sont collectés de manière empirique lorsque le ratio est stabilisé (voir chapitre 3 pour plus de détail).

3. Obtention des gammes de calibration

Les gammes sont obtenues comme décrit dans les chapitres 3 et 4. Elles correspondent à un ratio de fluorescence fonction du pH. Quel que soit le mode de calibration, l'intensité de fluorescence est mesurée grâce au logiciel Fiji (Image J) en veillant à ce que l'intensité des pixels choisis soit supérieure au bruit de fond mais non saturée. La gamme sigmoïdale du ratio de fluorescence fonction du pH est produite à l'aide du logiciel GraphPad Prism.

VI. Imagerie

1. Sondes fluorescentes et drogues utilisées

	F-STS	Oregon green (OG)	BCECF-AM	Iodure de propidium (IP)	COS^{488} et COS^{647}
Origine/ référence	Invitrogen F1130	Invitrogen D6145	Acros Organics AC401740010	Invitrogen P3566	J. Mraveck (Mraveck et al., 2014)
Concentration	100µM	10µM	11,4µM	3µM	1/1000

Tableau 4 : Liste des sondes fluorescentes utilisées.

2. Microscopes et réglages

Le macroscope Axiozoom V16 de Zeiss est principalement utilisé pour trier les plantules transformées. Il est équipé d'un objectif PlanNeoFluar Z 1,0X/ 0,25 FWD 56mm et d'une source LED Xylis fibrée pour la fluorescence. Les filtres disponibles sont détaillés dans le tableau 5. Les images sont prises à l'aide d'une caméra monochrome Hammamastu Orca Flash 4 et du logiciel ZEN 3.

Fluorochrome	Réglages	
TagBFP2	EX 325-390	EM 445/50
pHluorine/ SYFP2	EX 470/40	EM 525/50
RFP	EX 545/25	EM 605/70

Tableau 5 : Détail des filtres utilisés du macroscope Axiozoom V16.

Le microscope inversé à épi fluorescence observer 7 ApoTome de Zeiss est équipé d'une source Xcite 120 LED et d'une caméra monochrome Hammamastu Orca Fllash 4 et du logiciel ZEN 2. Les filtres présents dans la tourelle de filtres sont listés dans le tableau 6.

Fluorochrome	Réglages	
TagBFP2	EX 325-390	EM 445/50
pHluorine/ SYFP2	EX 470/40	EM 525/50
RFP	EX 545/25	EM 605/70

Tableau 6 : Détail des filtres du microscope à épifluorescence observer 7 Zeiss.

Le microscope inversé confocal Leica SP8 est équipé d'objectifs 20X HC Plan Apochromat 0.7 NA CS et 40X HCX Plan Apochromat CS 1.1 NA à eau et de lasers HeNe

405nm, Argon (458, 476, 488, 496 et 514 nm), DPSS 561nm et HeNe 633nm et d'un détecteur PMT et deux PMTs hybrides. Les réglages utilisés pour les différents fluorochromes sont listés dans le tableau 7. Les images sont prises à l'aide du logiciel Leica Las X.

Fluorochrome	**Réglages**	
TagBFP2	EX 405nm	EM 450-490nm
pHluorin	EX 476nm EX 496nm	EM 505-550nm EM 505-550nm
F-STS	EX 458 EX 488	EM 500-550nm EM 500-550nm
OG	EX 488 EX 496	EM 500-550 EM 500-550
SYFP2	EX 514nm	EM 520-575nm
RFP	EX 561nm	EM 590-630nm
COS^{647}	EX 633	EM 650-700nm
COS^{488}	EX 488nm	EM 500-550nm
IP	EX 488	EM 570-700nm

Tableau 7 : Filtres utilisés au microscope confocal Leica Sp8.

Le microscope inversé à épifluorescence Zeiss Axiovert 200M permet d'obtenir des données ratiométriques en temps réel. Il est utilisé pour observer la pointe de la racine primaire en croissance et permet d'injecter des traitements. Il est équipé d'une source LED lumencor Spectra 7 et d'une source LED HUB Omicron ainsi que d'une roue de filtres externe Lambda 10-B Sutter permettant d'illuminer séquentiellement et rapidement les échantillons. Les filtres utilisés sont détaillés dans le tableau 8.: Les observations sont réalisées avec un objectif 10X/0,3 NA Plan Neofluar, les images sont prises toutes les 5 secondes grâce à une caméra monochrome (CoolSNAP HQ ; Photometrics) et les ratios de fluorescence sont visualisés à l'aide du logiciel d'imagerie ratiométrique MetaFluor.

Fluorochrome	Réglages	
TagBFP2	EX 385	EM 525/45
pHluorine	EX 390/18 EX 475/28	EM 535/30 EM 535/30
SYFP2	EX 470/28	EM 525/45
RFP	EX 514/10	EM 600/50

Tableau 8 : Liste des filtres du microscope inversé à épifluorescence Zeiss Axiovert 200M.

3. Imagerie confocale

- Plantules d'Arabidopsis :

Les plantules d'Arabidopsis sont observées à 5j. Le montage est décrit dans le matériel et méthode du chapitre 2. Brièvement, les plantules sont transférées 24h avant l'observation sur un milieu solide sans MES coulé en fine épaisseur sur des lames. Avant observation, le système lame + milieu + plantule est découpé et une lamelle est apposée sur la plantule. Le montage est maintenu au moins 30 min à la verticale avant observation.

- Tabacs :

Une portion de feuille près du site d'infiltration est découpée à l'aide d'une lame de scalpel et montée entre lame et lamelle avec de l'eau pour observation en microscopie. Pour les traitements, ils sont infiltrés dans une portion de feuille juste avant le découpage et l'échantillon est monté en présence de la drogue.

- Baies de raisin :

La baie est prélevée sur la grappe et de fines coupes transversales sont réalisées pour permettre l'observation. La base du raisin et le pédicelle sont coupés avec une lame de rasoir et la baie est fixée pas sa base avec de la colle forte sur le support d'un vibratome micro-cut H1200 Biorad. 5 à 6 coupes de 150 à 200µm d'épaisseur son réalisées par baie avec un protocole à faible vitesse et intensité de coupe. Les coupes sont rincées dans une solution de saccharose d'une concentration allant de 350 à 750mM selon le stade de développement et supplémentée avec 5mM de KCl et 100µM de $CaCl_2$. Les coupes sont ensuite montées entre lame et lamelle avec cette même solution. Les échantillons sont observés à partir d'une semaine post transformation et jusqu'à la fin de la maturité de la baie de raisin.

4. Imagerie ratiométrique

Les plantules d'Arabidopsis de 5-6 jours présélectionnées pour leur fort signal fluorescent sont observées avec le microscope à épifluorecsence Zeiss Axiovert. 24h avant l'observation, les plantules sont transférées dans une boite carrée sur des lamelles recouvertes d'une fine couche de milieu MS/2, 1% de sucrose, 0,5% de phytagel sans MES pH5,8. Chaque boite contient 4 lamelles alignées et 25mL de milieu. Les boites sont remises en chambre de culture jusqu'au lendemain. 5h avant observation, 20µL de MS/2 1% sucrose pH5,8 sont déposés sur chaque plantule qui est recouverte d'une nouvelle et le montage est remis en chambre de culture en position verticale. Cette apposition et le faible pourcentage de phytagel permettent à la racine de s'enfoncer légèrement dans le milieu pour qu'elle ne se dessèche pas et ne bouge pas lors des traitements tout en permettant la croissance. 1h avant observation, la lamelle du dessus est retirée. La lamelle du dessous avec le milieu qui la recouvre et la plantule est découpée puis recouverte d'une chambre d'observation (Figure 2A) qui est fixée avec de la graisse de silicone (Figure 2B). Les chambres montées sont placées à l'horizontal dans une nouvelle boite carrée avec un papier humidifié en attendant l'observation.

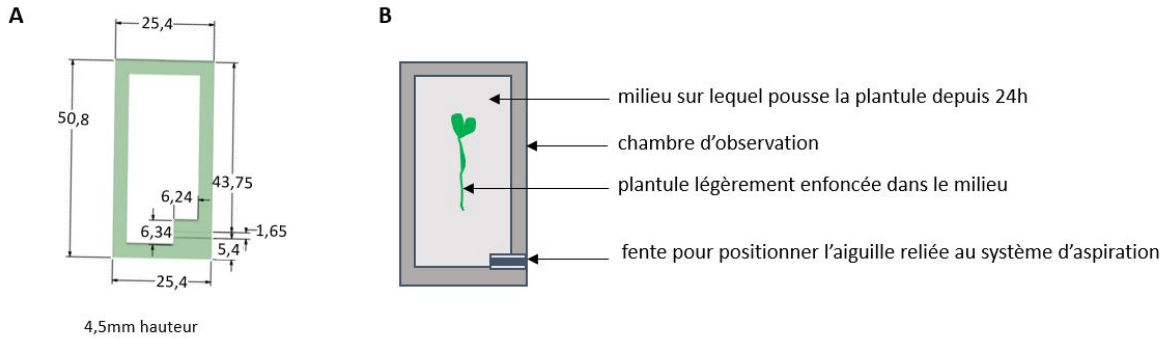


Figure 2 : Système d'observation des plantules d'Arabidopsis au ratiométrique. A) Cotes de la chambre d'observation (en mm) fabriquée à l'aide d'une imprimante 3D. B) Montage réalisé avec la chambre d'observation permettant d'injecter un traitement et d'observer la fluorescence.

Les traitements et tampons sont injectés manuellement au niveau de la racine et aspirés par une aiguille connectée à un tuyau qui est relié à une pompe à vide.

VII. Analyse des images et données et statistiques

1. Mesures de pH et analyses des images

Les images sont analysées à l'aide du logiciel Fiji (ImageJ). Dans un premier temps, les deux canaux sont convertis en 32 bits. Les valeurs de pH des échantillons végétaux sont obtenues en collectant les ratios de fluorescence dans des ROI sélectionnées manuellement aux mêmes conditions que la gamme et en utilisant la fonction « interpolate » de GraphPad Prism.

Les images ratiométriques sont générées par la macro « image calculator » de Fiji en divisant l'image collectée dans un canal par l'image collectée dans le second canal 2.

Les différentes régions de la pointe racinaire sont définies manuellement. La zone de transition et le début de la zone d'élongation sont définis sur la base de critères morphologiques (taille des cellules). La zone de transition correspondant aux 5 cellules de l'épiderme qui commencent à s'allonger mais dont la longueur ne dépasse pas le double de la largeur.

2. Obtention de données de croissance

Les séries d'images ratiométriques de pointes racinaires sont transformées en kymographe avec la fonction « mulitkymograph » de Fiji à partir d'une ligne d'une largeur de 20 pixels qui part de la coiffe racinaire est tiré le long de la racine. Sur le kymographe obtenu, la position de la pointe racinaire en fonction du temps est marquée à différents temps grâce à la fonction « Multi-point ». Les coordonnées de ces points sont extraites par la fonction « save as XY coordinates » et permettent de calculer l'élongation de la racine en fonction du temps.

Chapitre 1: pH biosensing in the plant apoplast- a focus on root cell elongation

doi:10.1093/plphys/kiab313 PLANT PHYSIOLOGY 2021: 00: 1–11

Plant Physiology®

Update

pH biosensing in the plant apoplast—a focus on root cell elongation

Hortense Moreau [1], Sabine D. Zimmermann [1], Isabelle Gaillard [1] and Nadine Paris [1,*,†]

1 BPMP, Univ Montpellier, CNRS, INRAE, Montpellier SupAgro, Montpellier, France

*Author for comunication: nadine.paris@cnrs.fr
†Senior author.

All authors contributed equally to writing and corrections. H.M. and N.P. contributed to figure design.

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (https://academic.oup.com/plphys/pages/general-instructions) is: Nadine Paris (nadine.paris@cnrs.fr).

Abstract

The pH parameter of soil plays a key role for plant nutrition as it is affecting the availability of minerals and consequently determines plant growth. Although the mechanisms by which root perceive the external pH is still unknown, the impact of external pH on tissue growth has been widely studied especially in hypocotyl and root. Thanks to technological development of cell imaging and fluorescent sensors, we can now monitor pH in real time with at subcellular definition. In this focus, fluorescent dye-based, as well as genetically-encoded pH indicators are discussed especially with respect to their ability to monitor acidic pH in the context of primary root. The notion of apoplastic subdomains is discussed and suggestions are made to develop fluorescent indicators for pH values below 5.0.

Introduction

The study of pH in cellular physiology is of primary importance to understanding its involvement in a multitude of biological reactions. As plants are sessile organisms, they must adapt to local environment factors such as light, temperature, atmospheric carbon dioxide, and humidity, as well as soil characteristics, for which knowledge of pH is essential. With respect to plant nutrition, the soil pH affects the solubility, mobility, and availability of minerals. While several microelements like Al, Fe, and Mn are more bioavailable and potentially toxic in acidic soil ($pH \leq 5.5$), major nutrients such as P, K, and nitrogen (N) become less bioavailable in these conditions, causing nutrient deficiency (Ginocchio et al., 2009; Soti et al., 2015). Furthermore, some membrane ion channels and transporters could be regulated by local external acidic pH (Zeng et al., 2015). Finally, acidic soil represents 30% of the ice-free land globally and is, therefore, a major constraint for most cultivated plants.Understanding how external pH is perceived by roots is essential for plant physiology. Soil pH is one of the many environmental conditions that affect nutrient availability (Maathuis, 2009). The

ADVANCES

- Genetically encoded pH sensors in the range of pH 5.5–8 have been designed and used to monitor pH in living plant cells.
- Precise spatial localization of sensors can be achieved thanks to our increasing knowledge of the targeting processes of proteins.
- High-definition imaging capabilities to detect fluorescence signals in living tissue are available.
- Quantification of local absolute pH has been achieved.

Received April 16, 2021. Accepted June 19, 2021. Advance access publication July 13, 2021
© American Society of Plant Biologists 2021. All rights reserved. For permissions, please email: journals.permissions@oup.com

Downloaded from https://academic.oup.com/plphys/advance-article/doi/10.1093/plphys/kiab313/6320797 by guest on 15 September 2021

ability to regulate pH is essential as it participates in the plasma membrane (PM) proton-motive force generated by the activity of P-type H^+-ATPases, which are the driving force for the uptake of minerals by transporters and channels (Nelson, 1994). Moreover, growth mechanisms such as cell elongation and expansion triggered by high intracellular turgor pressure are controlled by pH (Rayle and Cleland, 1970). Although the monitoring of proton concentrations in living tissue has greatly improved in the past two decades, thanks to fluorescent probes, our ability to accurately measure pH variations in an acidic range $pH < 5$ remains challengin.

In this review, we provide an update on fluorescent pH probes available for live imaging, and we report on various technical limitations induced by acidic pH. The most adapted sensors to acidic pH are discussed in the context of pH perception in the apoplast in relation to cell elongation, with a special focus on primary root growth. Finally, we examine the potential for genetically encoded fluorescent proteins (FPs) in future studies.

Apoplastic pH is a master regulator of plant growth processes

In plants, the most acidic pH values reported so far in the endomembrane system correspond to the lumen of the trans-Golgi network/early endosome and the vacuole (Bassil et al., 2011; Martinière et al., 2013a, 2013b; Luo et al., 2015; Dragwidge et al., 2019). Depending on the approach, pH levels have been reported in the apoplast of elongating tissue in the range of 4.5–5.5, as shown recently in the apical meristem of Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) primary root (Barbez et al., 2017). Moreover, pH levels have been predicted to reach values as acidic as 3.5 in soybean (*Glycine max*) hypocotyls (Yu et al., 2000). Although the mechanisms underlying the perception of external pH have been elucidated in detail for bacteria, fungi, and mammalian cells, little information is available on whether (and if so, how) external pH is perceived by plants (Tsai and Schmidt, 2021).

Plant cells are surrounded by a cell wall (CW) that not only provides protection and rigidity, but which also acts as an obstacle to cell elongation. Therefore, CW extensibility is required to accommodate cell expansion driven by turgor pressure. Early plant physiology research looked at how the CW could loosen itself in order to allow cell elongation, resulting in the "acid growth" theory (Rayle and Cleland, 1970). Since the 1970s, a stunning amount of data has been obtained, primarily in epicotyls or hypocotyls, resulting in the emergence of cell elongation models in which the plant hormone auxin plays a central role. Much progress has been made in our understanding of the molecular mechanisms of auxin signal transduction as well as the basic machinery involved in its directional distribution (Du et al., 2020). One of the central responses of auxin is the activation of the PM H^+-ATPase upon phosphorylation of its penultimate Thr, resulting in an efflux of protons (Takahashi et al., 2012). This acidification modifies the activity of CW enzymes including expansins, xyloglucan endotransglycosylases/hydrolases, and pectin methylesterases that in turn affect CW extensibility. Increased proton secretion leads to the hyperpolarization of the PM that ensures solute and consequently water uptake, both of which are required to maintain turgor pressure for cell elongation (Arsuffi and Braybrook, 2018; Du et al., 2020).

The acid growth theory in the specific context of the primary roots

In comparison to the hypocotyl, where pH dynamics after gravi-stimulation have been clearly reported using genetically encoded pH indicators (Fendrych et al., 2016), the primary root tip model is far more complex (Figure 1A). This structure is composed of the root cap with its protective cuticle (Berhin et al., 2019); the meristem, separated from the elongation zone by a transition zone whose position and maintenance determine the final root size; and the elongation and maturation zones, where most of the ion uptake from the soil takes place, through the root hairs. In Arabidopsis, the meristem sets its final size 5 d after germination, when a dynamic equilibrium is established between cell division and cell differentiation (Pacifici et al., 2015). At the organ scale, proton flux is a complex phenomenon with two proton-efflux zones at the level of the root cap and the elongation zone, while in the meristem and the transition zone, protons are taken up by the root (Collings et al., 1992; Staal et al., 2011). Even more complex, dynamic recordings of pH have demonstrated that growth is a discontinuous process associated with pulses of acidification, as clearly shown at the organ level in roots (Monshausen et al., 2011) as well as the cellular level in root hairs (Monshausen et al., 2007). The acid growth theory is more controversial regarding the root tissue, and it is important to differentiate root growth from cell elongation. Recent studies on distal meristematic root cells indicate that high concentrations of auxin induce a transient alkalinization of the apoplast followed by acidification, but only after several hours (Barbez et al., 2017). In contrast, cell elongation is altered when the endogenous auxin response is impaired by genetic approaches. These data confirm a complex role of auxin in root growth, most likely in relation to its local concentration.

Plant roots must constantly adjust their growth and development to the local constraints of a changing soil environment. Peptide hormones play numerous physiological roles during root development (Hsiao and Yamada, 2021), and one emerging model of apoplastic pH regulation involves two hormone peptides that have antagonistic actions on H^+-ATPase activity. The acidifying plant tyrosine sulfated peptide 1 (PSY1) interacts with the receptor kinase PSY1R to trigger phosphorylation of the auto-inhibitory loop of H^+-ATPase (Amano et al., 2007; Fuglsang et al., 2014), while the rapid alkalinization factor (RALF) binds the *Catharanthus roseus* RLK1-LIKE cell receptor kinase FERONIA, indirectly leading to inhibition of H^+-ATPase (Pearce et al., 2001). Interestingly, while directly activating

Downloaded from https://academic.oup.com/plphys/advance-article/doi/10.1093/plphys/kiab313/6320797 by guest on 15 September 2021

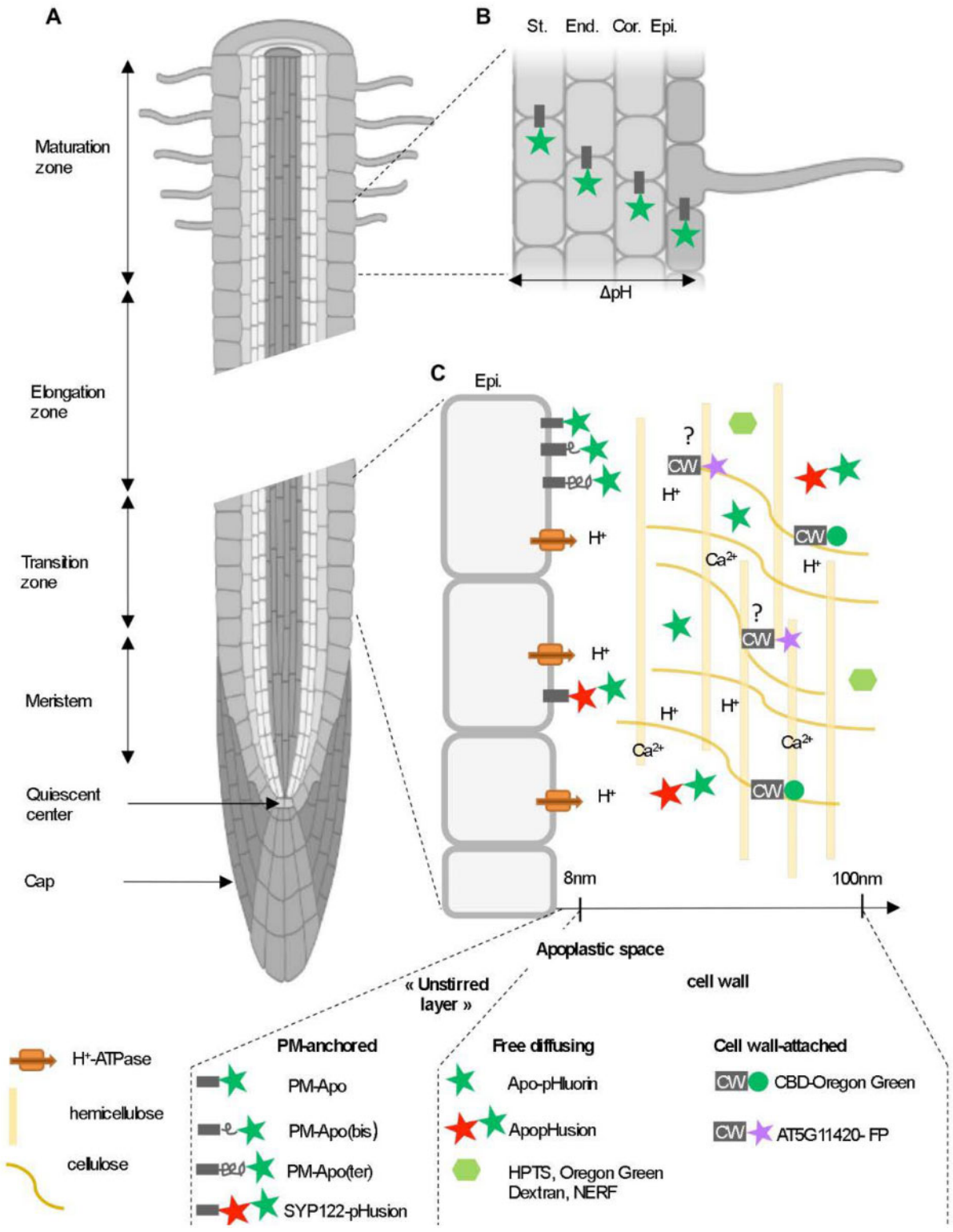


Figure 1 Schematic representation of a primary root apex with the different published fluorescent sensors for the apoplast. A, The different zones of the root, from the apex to the maturation zone. B, A detailed transverse section of the maturation zone with the PM-anchored pHluorin, PM-Apo. This sensor is detected down to the stele in living root, and reveals an acidic pH gradient in the apoplast that extends from the surface to the stele. PM-Apo reports pH close to the PM and is insensitive to short-term changes in membrane polarization (Martinière et al., 2018). Epi: epidermis; Cor: cortex; End: endodermis; St: stele. C, A detailed longitudinal section of the epidermis in the transition zone, with pH biosensors in various subdomains of the apoplast, including the "unstirred layer" and the CW. PM-Apo, PM-Apo(bis), and PM-Apo(ter) are PM-anchored sensors; pHluorin is fused to a transmembrane domain and a linker of variable length. SYP122-pHusion is a chimera of the PM SNARE SYP122 and pHusion (Kesten et al., 2019). CBD (Fasano et al., 2001). At5g11420-FP is an uncharacterized CW protein with unknown fine localization (indicated as "?") that is fused to FPs (Stoddard and Rolland, 2019). Apo-pHluorin is a freely diffusing form of pHluorin.

Downloaded from https://academic.oup.com/plphys/advance-article/doi/10.1093/plphys/kiab313/6320797 by guest on 15 September 2021

the H^+-ATPases and promoting cell elongation, PSY1 also induces the transcription of RALFs. This in turn triggers a response cascade involving an obligatory increase in cytosolic calcium, resulting in the inactivation of H^+-ATPase and consequently apoplast alkalinization and inhibition of cell elongation (Gjetting et al., 2020). This negative feedback mechanism could act as a switch to control cell elongation, but it remains to be determined how and where RALF affects the PSY1 response. The availability of genetically encoded biosensors sensitive to acidic pH would clearly benefit this field of research, as well as help to understand the physiological significance of the rapid responses to auxins that were observed in plants but are too fast (i.e. <2 min) to be transcriptional in nature (Dubey et al., 2021).

Apoplastic pH regulation in roots upon biotic interaction

Regarding the interaction with microorganisms, little is known about CW-related sensing and the downstream mechanisms involved in growth and defense responses, although several reports have shown apoplast pH to be involved in these responses. For example, in Arabidopsis, the *Pseudomonas syringae* type III effector protein AvrB induces stomatal opening through RPM1-interacting protein 4, a negative regulator of plant immunity, by inducing the PM H^+-ATPases AHA1 and AHA2 (Liu et al., 2009). The activation of AHA1 and AHA2 results in a hyperpolarization of the PM that initiates activation of the voltage-dependent channels, including inward rectifying K^+ channels. This entry of positive charges into the cell leads to water flux into the vacuole, resulting in guard cell turgidity and the consequent opening of the ostioles.

The chitin of the fungus *Serendipita* (*Piriformospora*) *indica* has also been described to induce alkalinization in the leaf apoplast (Felle et al., 2009). Recent work has highlighted that alkalinization of the apoplast is not the rule in terms of pathogen response, since rapid apoplastic acidification has been observed in Arabidopsis roots in response to the fungus *Fusarium oxysporum* (Kesten et al., 2019). In this example, fungal hyphae first attach to the root surface before penetrating between cells and growing toward the xylem, where the fungus can proliferate throughout the plant. In the xylem, this fungus secretes proteins named Secreted in Xylem, which serve to evade plant defense responses. Using a genetically encoded fluorescent sensor exposed within the root apoplast, the authors could follow the changes in apoplastic pH in real-time, finding that the Arabidopsis root epidermis responds with a strong acidification of the apoplast after 5 min of contact. The infection facilitation mechanism, which was attributed to an unknown secreted molecule that counteracts the alkalinization effect of chitin present in the elicitor mix, is mediated by phosphorylation-based proton pump activation. This acidification in turn triggers a reduction in cellulose synthesis that surprisingly leads to root growth reduction (Kesten et al., 2019).

The more global impact of acidic pH in the soil is also illustrated by transcriptomic studies on Arabidopsis roots (Lager et al., 2010). Indeed, 881 genes were differentially expressed after 8 h of exposure to acidic pH media (pH 4.5–6.5). These pH-regulated genes cluster with transcriptional responses to defense-related hormones (e.g. salicylic acid, auxins, and jasmonate) involved in the CW machinery and in calcium signaling. In contrast, no synergy of treatments was found on pH-induced genes compared to the effect of idole-3-acetic acid (IAA) or flagellin, supporting the hypothesis that pH acts as a signal for gene expression regulation. Altogether, pH plays an essential role in the tight interaction between plants and soil and beneficial microorganisms (Msimbira and Smith, 2020), underlying the importance of precisely monitoring pH within plant tissues and apoplastic environments.

Organization of primary root apoplast and the emerging role of pectin methylation in cell elongation

The apoplast is the space outside of the PM where water, ions, and nutrients can freely diffuse. Structurally, the apoplast includes the CW, the intercellular space, and the xylem–lumen space. Among the major ions, the level of protons in the apoplast is strictly maintained to energize numerous membrane transport processes and, in turn, to allow long-distance transport of nutrients within the plant. Depending on the plant species and tissue explored, pH values have been reported in the range of 3.5–8.3 in the apoplast (Yu et al., 2000). In growing cells, the primary wall is composed of strong, stable, and inextensible cellulose microfibrils embedded in a matrix of polysaccharides, the pectins, and hemicelluloses (Figure 1C). The current "biomechanical hotspot" model proposes that cellulose fibrils are connected together by a xyloglucan–cellulose amalgam with limited enzymatic accessibility (Cosgrove, 2016). In addition, a major role has recently been proposed for pectins, whose degree of methylesterification could control the chemistry and rheology of the CW (Wolf and Höfte, 2014; Haas et al., 2020). Since the activity of pectin methylesterases is controlled by pH, they are proposed to participate in a pH regulation loop (Majda and Robert, 2018; Hocq et al., 2021); additionally, they could be required for acid growth by local, spatial and temporal fine-tuning of the pectin methylesterification status (Hocq et al., 2017). The necessity of local and transient acidification of the CW is also supported by the fact that some enzymes with a major role in the acid growth response have an acidic pH optimum. This is the case for expansin, a key enzyme in CW remodeling, which has a maximal activity at pH ~4 (Cosgrove, 1998).

Available fluorescent probes in the acidic pH range

Initially, pH measurements in Arabidopsis or maize (*Zea mays*) roots were performed with H^+ microelectrodes

Downloaded from https://academic.oup.com/plphys/advance-article/doi/10.1093/plphys/kiab313/6320797 by guest on 15 September 2021

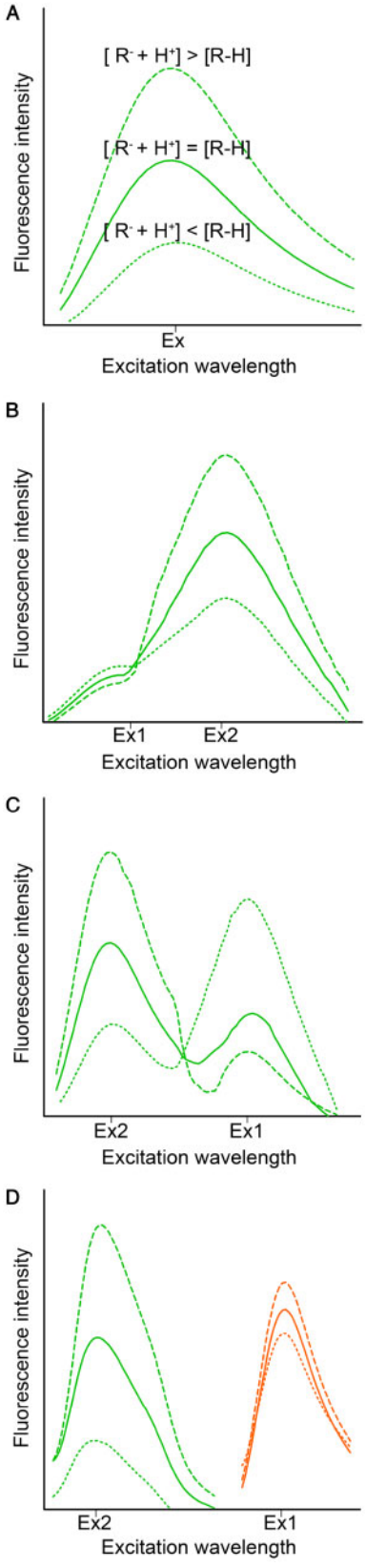


Figure 2 Schematic excitation spectra associated with the various types of pH biosensors used in plants. Hypothetical spectra are presented to illustrate the effect of pH on the protonated and deprotonated forms of a fluorochrome compared to the spectra at pKa (solid line), based on the assumption that fluorescence intensity increases for pH values above the pKa (dashed line) and decreases for pH lower than the pKa (dotted line). The anionic deprotonated state [R^-+H^+] is progressively converted to a protonated state [R−H] as pH decreases. Excitation wavelengths, Ex, Ex1, and Ex2, are indicated for each spectra as ideal wavelengths for either providing pH information (A) or generating a ratiometric pH titration curve (B–D) with Ex2 corresponding to the wavelength with higher pH sensitivity to pH compared to Ex1. Titration curves are obtained by plotting the fluorescence ratio Ex2/Ex1 as a function of applied pH that, in these examples, will increase with pH increase. A, Mono-excitation mono-emission type of spectra as for fluorescein. B and C, Dual-excitation mono-emission spectra as for BCECF and OG, with Ex1 at the isosbestic point (B) or pHluorin, with two peaks with opposite sensitivity to pH (C). D, Mix or fusion of two biosensors with mono-excitation mono-emission spectra, but with high (green) or low (orange) sensitivity to pH, as for pHusion.

developed in the 1970s (Miller and Gow, 1989; Peters and Felle, 1999; Staal et al., 2011). Although H^+ microelectrodes are capable of monitoring proton fluxes, they are difficult to manipulate and suffer from low spatial resolution. In contrast, fluorescent sensor measurements can be used to investigate the steady-state amounts of free protons in a given position. The use of fluorescent molecules to monitor pH in living tissues has dramatically expanded in the past 5 years, due in part to technical advances in microscopy that have much greater sampling capabilities. Fluorescent biosensors can be organic compounds or proteins targeted specifically to the chosen subcellular location thanks to trafficking signals, that is, peptidic motifs/domains that are sufficient to address a protein to a given subcellular localization. Here, we will present a selection of the most appropriate fluorescent molecules for monitoring pH in the acidic range, describe their advantages and limitations, and finally discuss strategies regarding how to expand the panoply of biosensors for pH.

Fluorescence is a process by which a molecule that is excited by high-energy light (i.e. a short wavelength) emits photons at a lower energy (i.e. a longer wavelength). An electron excited by an external source such as a laser moves from a ground state to an excited electronic singlet state. After a lag time of several picoseconds to nanoseconds (i.e. the lifetime), the excited electrons regain their fundamental equilibrium state and release their stored energy as emitted photons. The difference between the maxima excitation and the emission energy (wavelength) is known as the Stokes shift. This phenomenon can be affected by the physicochemical parameters of the environment (Abbyad et al., 2007). In the case of fluorescent probes used for pH measurements, the fluorochrome contains aromatic cycles with several π bonds that participate in the fluorescence emission. When the pH increases, the neutral protonated state is progressively converted to an anionic deprotonated form, and in the case of pH-dependent fluorochromes, the absorption properties of these two forms differ from each other in the range of visible light. These optical properties are exploited with imaging techniques to study the local pH

Downloaded from https://academic.oup.com/plphys/advance-article/doi/10.1093/plphys/kiab313/6320797 by guest on 15 September 2021

that is limited to the range of pH around the pKa of the fluorophore, that is, the pH value at which half of the molecules are in a protonated state (Figure 2A).

The preeminent dye in this ratiometric mode is fluorescein and its numerous derivatives. Fluorescein was discovered and synthesized by Adolf Von Baeyer at the end of the 19th century (Heimann and Wolf, 2007). It presents good absorptivity, fluorescence quantum yield, and solubility, and its intricate fluorescent properties are highly sensitive to pH (pKa = 6.4). An impermeant version of fluorescein coupled to dextran was used to measure external pH in close vicinity of Arabidopsis roots, revealing pH values in the range of pH 5.2–6.2 (Monshausen et al., 2009; Monshausen et al., 2011). A derivate, fluorescein isothiocyanate (FITC) coupled with dextran, was successfully used to measure apoplastic pH in *Vicia faba* leaves (pH 5.2) and roots (pH 4.8; Mühling and Sattelmacher, 1995; Mühling et al., 1998). Unfortunately, FITC alone does not penetrate tissues well, and requires pressure to be infiltrated or loaded through a long-term transpiration flux into leaves, which causes cell stress and modification of the basal pH value (Yu et al., 2000). Furthermore, fluorescein has known photobleaching issues, and part of its fluorescence is lost pH <7, making it unusable for acidic pH measurements.

Another fluorescent probe derived from fluorescein is 2′,7′-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein (BCECF). This probe has a pKa around 7 and a pH-dependent emission spectrum with a "shoulder" (Figure 2B) that allows a ratiometric pH measurement independent of the molecule's concentration (Table 1). In its membrane-permeable form, BCECF-acetoxymethyl ester (BCECF-AM) enters and accumulates within the vacuole, where it is used to measure luminal pH in the range of 5.7–5.9 in Arabidopsis root tips or in mature roots (Krebs et al., 2010; Martinière et al., 2013a). Oregon Green (OG) dye is another bimodal excitation-single emission probe. This fluorinated analog of fluorescein has a highly useful range of pH measurement in the acidic range (pH 2.5–5.5). In its cell impermeant form, OG 488 has been used to study apoplastic pH in living tissue (Table 1). Finally, the 8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid (HPTS) is a ratiometric fluorescent probe (Figure 2B) capable of functioning in weakly acidic environments (Table 1). HPTS has a pKa of 7.3, and its membrane impermeant properties make it useful for monitoring pH in the root apoplast when corresponding auxin signaling with cell elongation and in response to gravitropism (Barbez et al., 2017).

Alternatively, a mix of two cell membrane-impermeant dyes with different pKa values (and therefore different sensitivities to pH) can be used to monitor pH in a dual excitation/double emission mode (Figure 2D). This is the case for NERF-Cl fluorescent rhodol dye (pKa 3.8) and Texas Red Dextran (pKa 7.8), which were used to monitor local pH oscillations in root hair apoplasts associated with development (Bibikova et al., 1998), as well as in elongation of *Lupinus angustifolius* root epidermal cells in response to alkaline pH (Yu et al., 2001).

Genetically encoded pH biosensors compatible with acidic pH

The array of available genetically encoded fluorescence sensors has dramatically increased in the past 5 years, opening up many possibilities for in vivo pH studies. Since its first use as a gene reporter (Chalfie et al., 1994) and the removal of a cryptic intron by Jim Haselhoff, the *Aequorea victoria* green FP (GFP) and its derivatives have been widely used in plants. After translation and proper folding of the GFP, the fluorophore is self-generated by cyclization and oxidation of residues 65 through 67 (Ser-Tyr-Gly), forming a hydroxyphenyl ring (Wachter, 2007). Wild-type GFP has a bimodal excitation profile with optima at 395 and 475 nm corresponding to the protonated and deprotonated forms,

Table 1 Examples of fluorescent probes that have been used to monitor pH in plant acidic environments

Tool	pH Range	Organism/Localization	Physiological Processes	Ref.
NERF and Texas red dextran mixture	3–6	Arabidopsis root/apoplast *L. angustifolius* root elongation zone/apoplast	Apoplastic transient acidification at root hair initiation Response to high pH and to different sources of N supply	Bibikova et al. (1998) Yu et al. (2001)
BCECF-AM	5.5–8.5	Arabidopsis root and *Nicotiana tabacum* epidermis/vacuole	Native luminal vacuolar pH maintained by V-ATPase activity. Luminal pH gradient and protein trafficking to vacuole	Krebs et al. (2010) Martinière et al. (2013a)
HPTS	5–7.5	Arabidopsis root transition and maturation zone/apoplast	Auxin concentration-dependent role in apoplastic pH regulation controlling cell expansion and gravitropic response. Apoplastic pH estimation in maturation zone	Barbez et al. (2017) Martinière et al. (2018)
CBD-OG	2.5–5.5	Arabidopsis root/cellulosic CW	Rapid apoplastic pH acidification in root cap in response to gravitropism	Fasano et al. (2001)
OG-dextran	2.5–5.5	*Vicia faba* L. leaf/apoplast Arabidopsis root maturation zone/apoplast	Apoplastic alkalinization is involved in stomatal closure in response to salt stress. Apoplastic pH measurement	Geilfus et al. (2015) Martinière et al. (2018)

Downloaded from https://academic.oup.com/plphys/advance-article/doi/10.1093/plphys/kiab313/6320797 by guest on 15 September 2021

Table 2 Examples of available genetically encoded FPs composed of single molecule with ratiometric for actual or potential use in taking pH measurements

Tool	pH Range	Organism/Localization	Physiological Processes	Ref.
pHluorin	5.5–8	Arabidopsis and *N. tabacum* epidermis/ lumen of secretory organelles	Regulation of luminal pH in relation to vacuolar protein transport	Martinière et al. (2013a) Martinière et al. (2018)
		Arabidopsis root maturation zone/apoplast	Transmembrane pH gradient and ion uptake. Radial apoplastic pH gradient	
ratioGFP	5.6–7.8	Arabidopsis root/apoplast	Apoplastic pH alkalinization in root differentiating cells in response to salt stress	Gao et al. (2004)
A-17 pHuji	5.5–8	Arabidopsis root/cytosol	Proton dynamics upon ABA treatment	Waadt et al. (2020)

respectively. This feature was exploited to develop efficient ratiometric pH-sensitive versions, including the sensor pHluorin (Figure 2C;Miesenböck et al., 1998). The pHluorin sensor and its ratiometric equivalent At-pHluorin (ratioGFP) are sensitive to pH in the range of 5.5–8 (Gao et al., 2004; Schulte et al., 2006), and have been used to monitor steady-state pH in various cellular subcompartments of the cell, resulting in several breakthroughs in plant physiology (Table 2).

Although red versions of pH-sensitive FPs have been reported (Tantama et al., 2011; Li and Tsien, 2012; Shen et al., 2014), their sensitivity is limited to pH 6. Furthermore, to our knowledge, only A-17, a derivative of pHuji, has been tested in the plant cytoplasm (Waadt et al., 2020; Table 2).

Tandems of FPs with different pKa, and therefore different pH sensitivities, are another strategy that can be applied to generate genetically encoded pH sensors. For instance, the fusion of mRFP1 (pKa = 4.5) with eGFP (pKa = 6.15), named pHusion, has a pKa of 5.8 and allows a slightly improved pH sensibility in the acidic range when compared to pHluorin (Gjetting et al., 2012; Table 3). The tandem pHusion has already been successfully targeted to the apoplast in a freely diffusing form, and more recently it was anchored in the PM to monitor the real-time response to *F. oxysporum* fungal infection in roots (Kesten et al., 2019). Despite the ability of pHluorin and pHusion to monitor pH in plants, their pH restrictions within the acidic range limit them to physiological events occurring at a pH no lower than 4.5–5.

Potential and limitation of genetically encoded pH sensors

The apoplast is a complex environment with a CW structure, as detailed in the transition zone of the root in Figure 1C. Depending on the probe, the value of the apoplastic pH will need to be interpreted in the context of the corresponding subregion from which it comes. One of the main advantages of genetically encoded pH sensors is the nearly infinite possibility of their targeting to a given subcellular site. In the case of the apoplast, several engineered fusions have already been shown to efficiently report pH in roots. To monitor pH in close proximity to the PM, several previous studies anchored pH sensors using either a transmembrane domain (PM-Apo) together with a long or extra-long linker (PM-Apo(bis) and PM-Apo(ter), respectively) for pHluorin (Martinière et al., 2018), or they were fused to a SNARE SYP122 (SYP122-pHusion; Kesten et al., 2019). Membrane-anchored sensors, as opposed to their equivalent released in the apoplast (Gjetting et al., 2012; Martinière et al., 2018), do not diffuse away from the root. In addition, pH from cell layers below the surface is accessible. This has been shown with PM-Apo, in which pH can be monitored in each cell layer up to the central cylinder of the root, providing access to the apoplastic pH radial gradient in the mature portion of living roots (Figure 1B).

Freely diffusing sensors, such as HPTS, Apo-pHluorin, and ApopHusion, have the potential to label the entire CW (Figure 1C). In practice, HPTS poorly penetrates the space between the root epidermal cells (Martinière et al., 2018), whereas ApopHusion diffuses away from the apoplast (Gjetting et al., 2012). While the features that allow a probe to penetrate the CW are difficult to predict, this ability depends in part on the CW pores, whose size (30–50 Å; Carpita et al., 1979) may vary with the degree of pectin methylation (Willats et al., 2001). To circumvent the lack of retention in sensors over time, CW-targeting can be used as previously shown with a cellulose-binding domain (CBD) tagged with OG (Fasano et al., 2001); potentially, this could also be accomplished with an uncharacterized CW protein fused to FPs (Stoddard and Rolland, 2019).

To convert fluorescence ratios into pH values, a calibration curve must be produced using the emission ratio obtained after excitation at two wavelengths, in which the dynamic of change for the excitation profiles sufficiently differs due to pH (see Ex1 and Ex2 in Figure 2, B–D). The pH calibration of genetically encoded fluorescent sensors can be achieved either in situ or in vivo (Martinière et al., 2013b). In situ calibration uses a sensor produced from the bacteria *Escherichia coli* that is purified and mixed with different pH buffers. This recombinant protein can also be used for extensive spectrofluorometry characterization of the sensor under highly controlled conditions. Indeed, this technique has been used to investigate the sensitivity of pHluorin to various ionic or redox environments (Martinière et al., 2013a). This in situ calibration is a fast method, taking 10–15 min from frozen aliquot of purified sensor to results and can be repeated as many times as needed during the confocal session with the exact same settings used to observe the plant samples. Unfortunately, in situ calibration does not address any of the physicochemical parameters inherent to the sample that could potentially affect the fluorescence ratio and therefore the pH measurements. This

Downloaded from https://academic.oup.com/plphys/advance-article/doi/10.1093/plphys/kiab313/6320797 by guest on 15 September 2021

Table 3 Examples of available tandem-based pH sensor genetically encoded FPs for pH measurements

Tool	pH Range	Organism/Localization	Physiological Processes	Ref.
ApopHusion	4.5–7	Arabidopsis root elongation zone/apoplast Hypocotyl/apoplast	pH alkalinization in response to auxin in root. pH acidification is mediated by the tIR1/AFB-Aux/IAA auxin perception.	Gjetting et al. (2012) Fendrych et al. (2016)
SYP61-pHusion	4.5–7	Arabidopsis hypocotyl/TGN/EE	Role of V-ATPase in pH homeostasis in TGN/EE in relation to secretion and recycling.	Luo et al. (2015)
SYFP122-pHusion	4.5–7.5	Arabidopsis root elongation zone/apoplast	pH acidification involved in the regulation of growth/defense balance in response to biotic stress	Kesten et al. (2019)

Table 4 Example of FPs with low pKa that is functional in the plant endomembrane system that could be used to monitor pH in the acidic range

Tool	pKa	Organism/Localization	Tolerance to Acidic pH	Ref.
Turquoise2	pKa 3.1	*Nicotiana benthamiana* epidermal cell/CW	pH4/pH8 fluorescence intensity 64%	Stoddard and Rolland (2019)
mNeonGreen	pKa 5.7		pH4/pH8 fluorescence intensity 52%	
Gamillus	pKa 3.4		pH4/pH8 fluorescence intensity 69%	
TagRFP	pKa 3.8	–	pH4/pH8 fluorescence intensity 58%	

issue can be addressed by comparing the in situ value with that obtained from in vivo calibration methods. Essentially, this consists in a direct treatment of the plant sample expressing the sensor with a sufficient buffering capacity in the presence of a protonophore such as nigericin (Grillo-Hill et al., 2014) or a weak acid (Kesten et al., 2019), so as to ensure an equilibrium between the intracellular compartments and the bulk. The time required for equilibration can vary from a few minutes (Keinath et al., 2015) to an hour (Martinière et al., 2018) or even longer, and must be determined empirically. It must be noted that the physiological impact of pH clamping on the original in vivo environment of the sensor remains unknown. Whichever calibration method is chosen, it is important to keep in mind that it may affect the measurements. For these reasons, most studies refer to relative changes in pH rather than absolute pH.

Concluding remarks

The tandem strategy that was successfully used for pHusion could very well be extended to proteins with low pKa (Table 4). Among the large variety of available FPs, only a few have physical properties (Benčina, 2013) that make them suitable for monitoring pH in the acidic range (Shinoda et al., 2018).

To test this possibility, 10 FPs with low pKa were chosen and targeted either to the cytosol or the apoplast, and their in vivo fluorescence properties were examined in *Nicotiana benthamiana* epidermal cells (Stoddard and Rolland, 2019). In addition to their proper targeting to the apoplast, half of them responded well to bulk pH in vivo, ranked here from lowest to highest pKa: Turquoise2, Gamillus, TagRFP, mCherry, and mNeonGreen. In particular, mTurquoise2 and mCherry show efficient recovery after pH 4 treatments in vivo (Table 4).

As a proof of concept, the tandem pH-lemon, a fusion of mTurquoise2 with the FRET acceptor EYFP, was utilized in human cells, where it was reported to cover in vitro a pH range of 3–7 (Burgstaller et al., 2019). For a deeper understanding of apoplastic variations with regard to cell elongation, future work will need to target acidic tolerant pH sensors to CW polymers, as was done previously with CBD (Fasano et al., 2001). The chitosan oligosaccharide (COS) has been used to label mainly demethylated polysaccharide homogalacturonan (Mravec et al., 2014). A fusion of COS with OG could potentially provide a way to investigate local pH variation in pectin, in the CW. The recent design of biosensors allowing the direct visualization of auxin distribution in living tissues (Herud-Sikimić et al., 2021) illustrates our potentially infinite ability to design sensors for highly specific purposes. Fluorescence-lifetime imaging microscopy (FLIM) can also be used to measure pH when a higher temporal resolution is needed, since it only uses a single excitation wavelength. This method, which is insensitive to laser changes or fluorochrome concentration, exploits the fact that the fluorescence lifetime of a fluorochrome is affected by pH (including within the acidic range; Lin et al., 1999). These features have led to the successful use of FLIM to monitor pH in living tissue (Lin et al., 2003; Linders et al., 2021).

The PM is now viewed as a heterogenous environment (see Outstanding questions), where the formation of protein

OUTSTANDING QUESTIONS

- How far can we stretch the monitoring of proton exchange dynamics using fluorescent sensors?
- How specific to pH are fluorescent biosensors?
- Are there subdomains in the apoplast with specific pH values?
- How can pH be monitored in the CW, especially in relation to the pectin methylation status?
- How do plants perceive pH changes in the soil?

Downloaded from https://academic.oup.com/plphys/advance-article/doi/10.1093/plphys/kiab313/6320797 by guest on 15 September 2021

platforms is an essential step in plant responses to the environment (Bayle et al., 2021). In addition, technical advances in fluorescence microscopy allowing super-resolution live imaging at the subcellular scale (Shimizu et al., 2021) can be used to demonstrate the extreme dynamics of membranes. Future challenges will certainly involve integrating these fine plasticity dimensions in our pH sensor approaches. The ability to target tandem-based sensors with the appropriate range of pH detection at a given subcellular location will most likely result in very exciting research aimed at further connecting pH information with key mechanisms of plant responses to the environment.

Funding

This work was funded by the Homeowall project ANR-20-CE11-0008 from the Agence Nationale de la Recherche (ANR).

Conflict of interest statement. The authors declare no conflict of interest.

References

Abbyad P, Childs W, Shi X, Boxer SG (2007) Dynamic Stokes shift in green fluorescent protein variants. Proc Natl Acad Sci U S A **104**: 20189–20194

Amano Y, Tsubouchi H, Shinohara H, Ogawa M, Matsubayashi Y (2007) Tyrosine-sulfated glycopeptide involved in cellular proliferation and expansion in Arabidopsis. Proc Natl Acad Sci U S A **104**: 18333–18338

Arsuffi G, Braybrook SA (2018) Acid growth: an ongoing trip. J Exp Bot **69**: 137–146

Barbez E, Dünser K, Gaidora A, Lendl T, Busch W (2017) Auxin steers root cell expansion via apoplastic pH regulation in *Arabidopsis thaliana*. Proc Natl Acad Sci U S A **114**: E4884–E4893

Bassil E, Tajima H, Liang YC, Ohto M, Ushijima K, Nakano R, Esumi T, Coku A, Belmonte M, Blumwald E (2011) The Arabidopsis Na+/H+ antiporters NHX1 and NHX2 control vacuolar pH and K+ homeostasis to regulate growth, flower development, and reproduction. Plant Cell **23**: 3482–3497

Bayle V, Fiche J-B, Burny C, Platre MP, Nollmann M, Martinière A, Jaillais Y (2021) Single-particle tracking photoactivated localization microscopy of membrane proteins in living plant tissues. Nature Protocols **16**: 1600–1628

Benčina M (2013) Illumination of the spatial order of intracellular pH by genetically encoded pH-sensitive sensors. Sensors **13**: 16736–16758

Berhin A, de Bellis D, Franke RB, Buono RA, Nowack MK, Nawrath C (2019) The root cap cuticle: a cell wall structure for seedling establishment and lateral root formation. Cell **176**: 1367–1378.e8

Bibikova TN, Jacob T, Dahse I, Gilroy S (1998) Localized changes in apoplastic and cytoplasmic pH are associated with root hair development in *Arabidopsis thaliana*. Development **125**: 2925–2934

Burgstaller S, Bischof H, Gensch T, Stryeck S, Gottschalk B, Ramadani-Muja J, Eroglu E, Rost R, Balfanz S, Baumann A, et al. (2019) pH-Lemon, a fluorescent protein-based pH reporter for acidic compartments. ACS Sens **4**: 883–891

Carpita N, Sabularse D, Montezinos D, Delmer DP (1979) Determination of the pore size of cell walls of living plant cells. Science **205**: 1144–1147

Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science **263**: 802–805

Collings DA, White RG, Overall RL (1992) Ionic current changes associated with the gravity-induced bending response in roots of *Zea mays* L. 1. Plant Physiol **100**: 1417–1426

Cosgrove DJ (1998) Cell wall loosening by expansins. Plant Physiol **118**: 333–339

Cosgrove DJ (2016) Catalysts of plant cell wall loosening. F1000Res **5**: F1000

Dragwidge JM, Scholl S, Schumacher K, Gendall AR (2019) NHX-type Na+(K+)/H+ antiporters are required for TGN/EE trafficking and endosomal ion homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. J Cell Sci **132**: jcs226472

Du M, Spalding EP, Gray WM (2020) Rapid auxin-mediated cell expansion. Annu Rev Plant Biol **71**: 379–402

Dubey SM, Serre NBC, Oulehlová D, Vittal P, Fendrych M (2021) No time for transcription-rapid auxin responses in plants. Cold Spring Harb Perspect Biol doi: 10.1101/cshperspect.a039891

Fasano JM, Swanson SJ, Blancaflor EB, Dowd PE, Kao T, Gilroy S (2001) Changes in root cap pH are required for the gravity response of the Arabidopsis root. Plant Cell **13**: 907–921

Felle HH, Waller F, Molitor A, Kogel K-H (2009) The mycorrhiza fungus Piriformospora indica induces fast root-surface pH signaling and primes systemic alkalinization of the leaf apoplast upon powdery mildew infection. Mol Plant Microbe Interact **22**: 1179–1185

Fendrych M, Leung J, Friml J (2016) TIR1/AFB-Aux/IAA auxin perception mediates rapid cell wall acidification and growth of Arabidopsis hypocotyls. eLife **5**: e19048

Fuglsang AT, Kristensen A, Cuin TA, Schulze WX, Persson J, Thuesen KH, Ytting CK, Oehlenschlæger CB, Mahmood K, Sondergaard TE, et al. (2014) Receptor kinase-mediated control of primary active proton pumping at the plasma membrane. Plant J **80**: 951–964

Gao D, Knight MR, Trewavas AJ, Sattelmacher B, Plieth C (2004) Self-reporting Arabidopsis expressing pH and [Ca2+] indicators unveil ion dynamics in the cytoplasm and in the apoplast under abiotic stress. Plant Physiol **134**: 898–908

Geilfus C-M, Mithöfer A, Ludwig-Müller J, Zörb C, Muehling KH (2015) Chloride-inducible transient apoplastic alkalinizations induce stomata closure by controlling abscisic acid distribution between leaf apoplast and guard cells in salt-stressed *Vicia faba*. New Phytol **208**: 803–816

Ginocchio R, De la Fuente LM, Sánchez P, Bustamante E, Silva Y, Urrestarazu P, Rodríguez PH (2009) Soil acidification as a confounding factor on metal phytotoxicity in soils spiked with copper-rich mine wastes. Environ Toxicol Chem **28**: 2069–2081

Gjetting SK, Mahmood K, Shabala L, Kristensen A, Shabala S, Palmgren M, Fuglsang AT (2020) Evidence for multiple receptors mediating RALF-triggered Ca2+ signaling and proton pump inhibition. Plant J **104**: 433–446

Gjetting SK, Ytting CK, Schulz A, Fuglsang AT (2012) Live imaging of intra- and extracellular pH in plants using pHusion, a novel genetically encoded biosensor. J Exp Bot **63**: 3207–3218

Grillo-Hill BK, Webb BA, Barber DL (2014) Chapter 23 - Ratiometric imaging of pH probes. *In* JC Waters, T Wittman, eds, Methods in Cell Biology, Academic Press, Cambridge, MA, pp 429–448

Haas KT, Wightman R, Meyerowitz EM, Peaucelle A (2020) Pectin homogalacturonan nanofilament expansion drives morphogenesis in plant epidermal cells. Science **367**: 1003–1007

Heimann H, Wolf S (2007) A practical guide to fluorescein angiography. *In* AM Joussen, TW Gardner, B Kirchhof, SJ Ryan, eds, Retinal Vascular Disease, Springer, Berlin, Heidelberg, Germany, pp 193–204

Herud-Sikimić O, Stiel AC, Kolb M, Shanmugaratnam S, Berendzen KW, Feldhaus C, Höcker B, Jürgens G (2021) A biosensor for the direct visualization of auxin. Nature **592**: 768–772

Hocq L, Habrylo O, Voxeur A, Pau-Roblot C, Safran J, Sénéchal F, Fournet F, Bassard S, Battu V, Demailly H et al. (2021) The pH-dependent processivity of Arabidopsis AtPME2 can control cell wall mechanical properties. bioRxiv 2021.03.03.433777

Hocq L, Pelloux J, Lefebvre V (2017) Connecting homogalacturonan-type pectin remodeling to acid growth. Trends Plant Sci **22**: 20–29

Hsiao YC, Yamada M (2021) The roles of peptide hormones and their receptors during plant root development. Genes **12**: 22

Downloaded from https://academic.oup.com/plphys/advance-article/doi/10.1093/plphys/kiab313/6320797 by guest on 15 September 2021

Keinath NF, Waadt R, Brugman R, Schroeder JI, Grossmann G, Schumacher K, Krebs M (2015) Live cell imaging with R-GECO1 sheds light on flg22- and chitin-induced transient [Ca2+]cyt patterns in Arabidopsis. Mol Plant **8**: 1188–1200

Kesten C, Gámez-Arjona FM, Menna A, Scholl S, Dora S, Huerta AI, Huang HY, Tintor N, Kinoshita T, Rep M et al. (2019) Pathogen-induced pH changes regulate the growth-defense balance in plants. EMBO J **38**: e101822

Krebs M, Beyhl D, Görlich E, Al-Rasheid KAS, Marten I, Stierhof YD, Hedrich R, Schumacher K (2010) Arabidopsis V-ATPase activity at the tonoplast is required for efficient nutrient storage but not for sodium accumulation. Proc Natl Acad Sci USA **107**: 3251–3256

Lager I, Andréasson O, Dunbar T, Andreasson E, Escobar MA, Rasmusson AG (2010) Changes in external pH rapidly alter plant gene expression and modulate auxin and elicitor responses. Plant Cell Environ **33**: 1513–1528

Li Y, Tsien RW (2012) pHTomato, a red, genetically encoded indicator that enables multiplex interrogation of synaptic activity. Nat Neurosci **15**: 1047–1053

Lin HJ, Herman P, Lakowicz JR (2003) Fluorescence lifetime-resolved pH imaging of living cells. Cytometry A **52**: 77–89

Lin HJ, Szmacinski H, Lakowicz JR (1999) Lifetime-based pH sensors: indicators for acidic environments. Anal Biochem **269**: 162–167

Linders PTA, ter Beest M, van den Bogaart G (2021) Fluorescence lifetime imaging of pH along the secretory pathway. bioRxiv 2021.03.29.437519

Liu J, Elmore JM, Fuglsang AT, Palmgren MG, Staskawicz BJ, Coaker G (2009) RIN4 functions with plasma membrane H+-ATPases to regulate stomatal apertures during pathogen attack. PLoS Biol **7**: e1000139

Luo Y, Scholl S, Doering A, Zhang Y, Irani NG, Di Rubbo S, Neumetzler L, Krishnamoorthy P, Van Houtte I, Mylle E, et al. (2015) V-ATPase activity in the TGN/EE is required for exocytosis and recycling in Arabidopsis. Nat Plants **1**: 1–10

Maathuis FJ (2009) Physiological functions of mineral macronutrients. Curr Opin Plant Biol **12**: 250–258

Majda M, Robert S (2018) The role of auxin in cell wall expansion. Int J Mol Sci **19**: 951

Martinière A, Bassil E, Jublanc E, Alcon C, Reguera M, Sentenac H, Blumwald E, Paris N (2013a) In vivo intracellular pH measurements in tobacco and Arabidopsis reveal an unexpected pH gradient in the endomembrane system. Plant Cell **25**: 4028–4043

Martinière A, Desbrosses G, Sentenac H, Paris N (2013b) Development and properties of genetically encoded pH sensors in plants. Front Plant Sci **4**: 523

Martinière A, Gibrat R, Sentenac H, Dumont X, Gaillard I, Paris N (2018) Uncovering pH at both sides of the root plasma membrane interface using noninvasive imaging. Proc Natl Acad Sci U S A **115**: 6488–6493

Miesenböck G, De Angelis DA, Rothman JE (1998) Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. Nature **394**: 192–195

Miller AL, Gow NAR (1989) Correlation between root-generated ionic currents, pH, fusicoccin, indoleacetic acid, and growth of the primary root of *Zea mays*. Plant Physiol **89**: 1198–1206

Monshausen GB, Bibikova TN, Messerli MA, Shi C, Gilroy S (2007) Oscillations in extracellular pH and reactive oxygen species modulate tip growth of Arabidopsis root hairs. Proc Natl Acad Sci U S A **104**: 20996–21001

Monshausen GB, Bibikova TN, Weisenseel MH, Gilroy S (2009) Ca2+ regulates reactive oxygen species production and pH during mechanosensing in Arabidopsis roots. Plant Cell **21**: 2341–2356

Monshausen GB, Miller ND, Murphy AS, Gilroy S (2011) Dynamics of auxin-dependent Ca2+ and pH signaling in root growth revealed by integrating high-resolution imaging with automated computer vision-based analysis. Plant J **65**: 309–318

Mravec J, Kračun SK, Rydahl MG, Westereng B, Miart F, Clausen MH, Fangel JU, Daugaard M, Cutsem PV, Licht HHDF, et al. (2014) Tracking developmentally regulated post-synthetic processing of homogalacturonan and chitin using reciprocal oligosaccharide probes. Development **141**: 4841–4850

Msimbira LA, Smith DL (2020) The roles of plant growth promoting microbes in enhancing plant tolerance to acidity and alkalinity stresses. Front Sustain Food Syst **4**: 106

Mühling KH, Sattelmacher B (1995) Apoplastic ion concentration of intact leaves of field bean (*Vicia faba*) as influenced by ammonium and nitrate nutrition. J Plant Physiol **147**: 81–86

Mühling KH, Wimmer M, Goldbach HE (1998) Apoplastic and membrane-associated Ca2+ in leaves and roots as affected by boron deficiency. Physiol Plant **102**: 179–184

Nelson N (1994) Energizing porters by proton-motive force. J Exp Biol **196**: 7–13

Pacifici E, Polverari L, Sabatini S (2015) Plant hormone cross-talk: the pivot of root growth. J Exp Bot **66**: 1113–1121

Pearce G, Moura DS, Stratmann J, Ryan CA (2001) RALF, a 5-kDa ubiquitous polypeptide in plants, arrests root growth and development. Proc Natl Acad Sci U S A **98**: 12843–12847

Peters WS, Felle HH (1999) The correlation of profiles of surface pH and elongation growth in Maize roots. Plant Physiol **121**: 905–912

Rayle DL, Cleland R (1970) Enhancement of wall loosening and elongation by acid solutions. Plant Physiol **46**: 250–253

Schulte A, Lorenzen I, Böttcher M, Plieth C (2006) A novel fluorescent pH probe for expression in plants. Plant Methods **2**: 7

Shen Y, Rosendale M, Campbell RE, Perrais D (2014) pHuji, a pH-sensitive red fluorescent protein for imaging of exo- and endocytosis. J Cell Biol **207**: 419–432

Shimizu Y, Takagi J, Ito E, Ito Y, Ebine K, Komatsu Y, Goto Y, Sato M, Toyooka K, Ueda T, et al. (2021) Cargo sorting zones in the trans -Golgi network visualized by super-resolution confocal live imaging microscopy in plants. Nat Commun **12**: 1901

Shinoda H, Shannon M, Nagai T (2018) Fluorescent proteins for investigating biological events in acidic environments. Int J Mol Sci **19**: 1548

Soti PG, Jayachandran K, Koptur S, Volin JC (2015) Effect of soil pH on growth, nutrient uptake, and mycorrhizal colonization in exotic invasive Lygodium microphyllum. Plant Ecol **216**: 989–998

Staal M, Cnodder TD, Simon D, Vandenbussche F, Straeten DVD, Verbelen J-P, Elzenga T, Vissenberg K (2011) Apoplastic alkalinization is instrumental for the inhibition of cell elongation in the Arabidopsis root by the ethylene precursor 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. Plant Physiol **155**: 2049–2055

Stoddard A, Rolland V (2019) I see the light! Fluorescent proteins suitable for cell wall/apoplast targeting in *Nicotiana benthamiana* leaves. Plant Direct **3**: e00112

Takahashi K, Hayashi K, Kinoshita T (2012) Auxin activates the plasma membrane H+-ATPase by phosphorylation during hypocotyl elongation in Arabidopsis. Plant Physiol **159**: 632–641

Tantama M, Hung YP, Yellen G (2011) Imaging intracellular pH in live cells with a genetically encoded red fluorescent protein sensor. J Am Chem Soc **133**: 10034–10037

Tsai HH, Schmidt W (2021) The enigma of environmental pH sensing in plants. Nat Plants **7**: 106–115

Waadt R, Köster P, Andrés Z, Waadt C, Bradamante G, Lampou K, Kudla J, Schumacher K (2020) Dual-reporting transcriptionally linked genetically encoded fluorescent indicators resolve the spatiotemporal coordination of cytosolic abscisic acid and second messenger dynamics in Arabidopsis. Plant Cell **32**: 2582–2601

Wachter RM (2007) Chromogenic cross-link formation in green fluorescent protein. Acc Chem Res **40**: 120–127

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

Downloaded from https://academic.oup.com/plphys/advance-article/doi/10.1093/plphys/kiab313/6320797 by guest on 15 September 2021

Wolf S, Höfte H (2014) Growth control: a saga of cell walls, ROS, and peptide receptors. Plant Cell **26**: 1848–1856

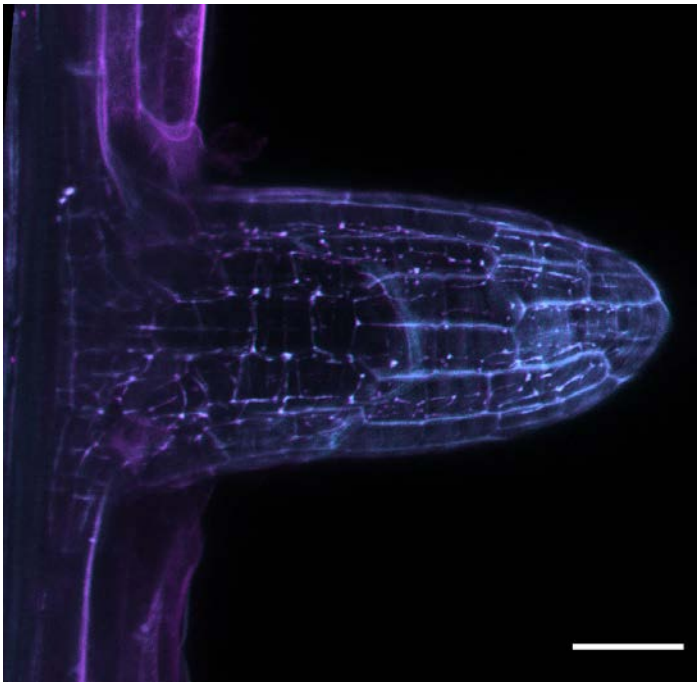
Yu Q, Kuo J, Tang C (2001) Using confocal laser scanning microscopy to measure apoplastic pH change in roots of *Lupinus angustifolius* L. in response to high pH. Ann Bot **87**: 47–52

Yu Q, Tang C, Kuo J (2000) A critical review on methods to measure apoplastic pH in plants. Plant Soil **219**: 29–40

Zeng WZ, Liu DS, Liu L, She L, Wu LJ, Xu TL (2015) Activation of acid-sensing ion channels by localized proton transient reveals their role in proton signaling. Sci Rep **5**: 14125

Downloaded from https://academic.oup.com/plphys/advance-article/doi/10.1093/plphys/kiab313/6320797 by guest on 15 September 2021

Chapitre 2 : Développement et caractérisation de nouveaux senseurs de pH génétiquement encodés adaptés à un environnement acide



Racine secondaire exprimant l'Apo-Acidine2. Cyan= signal de la TagBFP2 et magenta = signal de la mRFP. Barre d'échelle = 20µm.

Chapitre 2 : Développement et caractérisation de nouveaux senseurs de pH génétiquement encodés adaptés à un environnement acide

Introduction :

Comme discuté dans le chapitre 1, les senseurs de pH génétiquement encodés sont de puissants outils pour l'étude *in vivo* de nombreux processus cellulaires impliquant des variations de pH. Ils sont généralement constitués d'une ou deux protéines fluorescentes dont les spectres d'excitation/ d'émission possèdent une sensibilité au pH. Deux senseurs de pH génétiquement encodés ont déjà été exprimés en cellules de plante : la pHusion et la pHluorine (Gjetting et al., 2012 ; Kesten et al 2019 ; Martinière et al., 2013, 2018). Toutefois, ces deux senseurs possèdent un pKa élevé, respectivement 5,8 et 6,9, et ne permettent pas de de mesurer des pH inférieurs à pH 4,5 (Figure II.1).

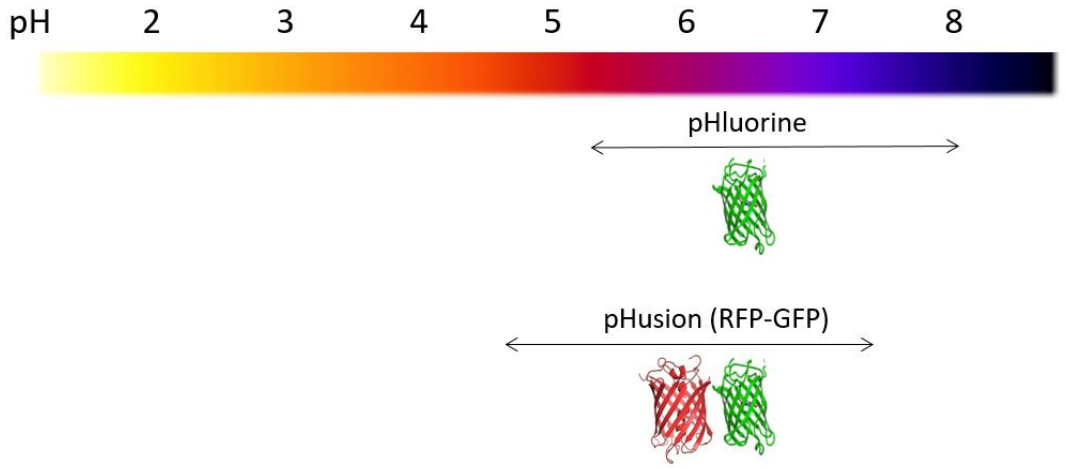


Figure II.1 : Gamme de pH couverte par les senseurs de pH génétiquement encodés disponibles. La couverture des pH acides est limitée car la pHusion permet des mesures de pH au plus bas à pH4,5.

La sensibilité aux pH acides de ces deux senseurs est limitante pour répondre au principal objectif de ce projet qui vise à mesurer le pH des raisins qui s'étend de 2,5 à 3,5 au cours du développement. Ainsi, ce chapitre expose le travail de développement et de caractérisation de nouveaux senseurs de pH génétiquement encodés adaptés à un environnement acide. Les résultats obtenus font l'objet d'une publication soumise à « Journal of Experimental Botany ».

L'approche choisie est de fusionner en tandem deux protéines fluorescentes de faible pKa et présentant une différence de sensibilité au pH. L'hypothèse étant que le faible pKa va

permettre la détection de signal fluorescent en environnement acide et la différence de sensibilité devrait permettre d'extraire des ratios de fluorescence de ces tandems et d'en déduire des informations de pH. Cette approche a déjà été utilisée en plante avec la pHusion (mRFP-GFP) et dans le monde animal avec la pH lemon (mTurquoise2-EYFP) (Gjetting et al., 2012 ; Burgstaller et al., 2019). Néanmoins, le choix de protéines fluorescentes appropriées et dont la fonctionnalité en plante a été établie est limitée (Stoddard et Rolland, 2019).

Résultats: Genetically encoded fluorescent sensors adapted to acidic pH highlight subdomains within the plant apoplast.

Genetically encoded fluorescent sensors adapted to acidic pH highlight subdomains within the plant cell apoplast.

Hortense Moreau, Isabelle Gaillard and Nadine Paris.

BPMP, Univ Montpellier, CNRS, INRAE, Montpellier SupAgro, Montpellier, France

hortense.moreau@supagro.fr

isabelle.gaillard@inrae.fr

nadine.paris@cnrs.fr

Submitted the 28th June 2021

# of Figures: 7

# of Supplemental Figures: 7

# of video: 3

Word number: 4522

Running title: Apoplast complexity revealed with pH sensors for acidic pH

Highlight

With genetically encoded tandems of fluorescent proteins optimized for acidic pH measurement, we showed that the apoplast is a complex environment regarding sensor coverage with pH heterogeneity in pavement cells.

Abstract

Monitoring pH is one of the challenges in understanding diverse physiological regulations as well as ionic balance, especially in highly acidic environments such as the apoplast and the vacuole. To circumvent the poor efficiency of pH measurements below pH 5, we designed three genetically encoded sensors composed of two fluorescent proteins in tandem. We selected fluorescent protein couples of low but sufficiently different pKa so that each couple could alternately serve as a pH sensor or as a pH-insensitive reference, depending on the pH imposed. The generated tandems, named acidin2, acidin3 and acidin4, were produced in *E. coli* and purified. Altogether, the generated tandems cover a pH range of 3-7.5. The acidins were targeted either for release in the apoplast (Apo) or for anchoring at the outer face of the plasma membrane (PM-Apo), with the fluorescent part exposed in the apoplast. Apoplastic acidins in stably transformed *Arabidopsis thaliana* primary roots responded immediately and reversibly to pH changes, directly reporting physiological conditions related to cell elongation. Although membrane-anchored acidins were evenly distributed at the cell periphery, we found a limited distribution of freely diffusing forms, revealing a complex apoplast with occasional instances of pH heterogeneity.

Keywords

root, acid growth, apoplast, biosensor, fluorescence, live imaging, pH

Introduction

Measuring pH in real-time is essential to understanding plant development and adaptation to environmental changes. At the cellular level, the tightly regulated pH of endomembrane compartments is used to control functional protein trafficking (Martinière *et al.*, 2013; Dragwidge *et al.*, 2019), especially in the lumen of the trans-Golgi network/early endosome (TGN/EE). This network operates as a sorting platform at the intersection of the vacuolar/secretion/endocytosis pathways, with a luminal steady state pH of 5.32 (Dragwidge *et al.*, 2019) under constant remodeling (Shimizu *et al.*, 2021). The pH also plays a central role in controlling cell elongation. Based on the 'acid growth theory', auxin triggers a transient acidification of the apoplast that in turn leads to the activation of enzymes such as expansins with an optimal activity at pH 4. The activity of expansin leads to an increase in cell wall extensibility to allow turgor pressure-mediated cell expansion (Rayle and Cleland, 1992). Regarding cell wall pH, a model of negative feedback was recently proposed for switching cell elongation on and off that involves two hormone peptides with antagonistic actions on H^+-ATPase activity. The acidifying 'plant peptide containing sulfated tyrosine 1' (PSY1) interacts with the receptor kinase PSY1R and triggers phosphorylation of the auto-inhibitory loop of H^+-ATPase (Amano *et al.*, 2007; Fuglsang *et al.*, 2014), while the rapid alkalinization factor (RALF) binds the *Catharanthus roseus* RLK1-LIKE cell receptor kinase FERONIA, indirectly leading to the inhibition of H^+-ATPase (Pearce *et al.*, 2001). Interestingly, PSY1 not only promotes cell elongation through its direct effect on H^+-ATPase, but also induces the transcription of some RALFs that can trigger a response cascade resulting in the inactivation of H^+-ATPase and, consequently, the inhibition of cell elongation (Gjetting *et al.*, 2020). This complex switch illustrates how pH homeostasis is tightly regulated in elongation and exemplifies the need to monitor apoplastic pH in living tissue with cellular to subcellular definition and no restrictions on the acidic range.

As for the TGN/EE lumen, a further understanding of the role of pH in these highly dynamic processes in cell elongation is limited by technical deficiencies that prevent accurate measurements in the acidic range, below pH 5. External *in vivo* pH measurements were originally achieved using H^+ microelectrodes in *Arabidopsis thaliana* (Staal *et al.*, 2011) and maize (Peters and Felle, 1999), and more recently with fluorescent dyes (Han and Burgess, 2010). The lowest published pH values in plants have been obtained in leaves (Geilfus and Mühling, 2012) and within the root apoplast (Martinière *et al.*, 2018) using the fluorescent probe Oregon Green (pKa 4.6), which is functional down to pH 2.5. However, this probe is rapidly internalized in root tip cells if it is not coupled to dextran. When Oregon Green was covalently attached to the cellulose binding domain (CBD) peptide from *Clostridium cellulovarans* cellulase, local cell wall acidification was reported (down to pH 4.3) in the root central elongation zone that was submitted to gravitropism (Fasano *et al.*, 2001). The probe 8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid (HPTS) has also been successfully used to monitor apoplastic pH in the root transition/elongation zone and has enabled studies of root expansion at the cellular level (Barbez *et al.*, 2017). Unfortunately, HPTS poorly penetrates the apoplast, resulting in transient labeling with limited sensitivity below pH 5.5 (Martinière *et al.*, 2018). Regarding genetically encoded fluorescent probes, pHluorin has successfully been used in plants (Miesenböck *et al.*, 1998), especially in the secretory pathway (Martinière *et al.*, 2013) and at the plasma membrane (PM), where it is well-tolerated (Martinière *et al.*, 2018). In order to further expand the performance of sensors in the acidic pH range, tandems of fluorescent proteins with various pH sensitivities have been developed. As an example of such tandem-based fluorescent sensors, pHusion (Gjetting *et al.*, 2012) has been successfully used in the plant endomembrane system (Luo *et al.*, 2015). This sensor is composed of a monomeric red fluorescent protein (mRFP) fused to an enhanced green fluorescent protein (EGFP), allowing pH measurements in the range of 4.5-7.5.

Here, we have designed new sensors adapted to acidic pH, similar to the recently published tandem pHlemon (Burgstaller *et al.*, 2019) that is comprised of the pH-insensitive mTurquoise2 and the pH-sensitive enhanced yellow fluorescent protein (EYFP). For our sensors, we selected proteins with a low pKa, including: Tag blue fluorescent protein (TagBFP; pKa 2.7) from *Entacmaea quadricolor* (Subach *et al.*, 2011); Gamillus (pKa 3.4), isolated from the jellyfish *Olindias formosus* (Shinoda *et al.*, 2018); and the synthetic yellow fluorescent protein 2 (SYFP2; pKa 6), a moderate acid-sensitive yellow protein derived from the *Aequorea victoria* mVenus (Kremers *et al.*, 2006). These fluorescent proteins were fused to mRFP (Campbell *et al.*, 2002) to generate three tandem biosensors that we have named acidins. The properties of the acidins were extensively analyzed by spectrofluorometry. Together with the formerly described pHluorin, the acidins extend our ability to measure pH changes from pH 3 to pH 8. Upon transient expression in tobacco epidermal cells, acidins targeted to the apoplast with either a transmembrane domain (TMD) or a signal peptide showed proper localization. In *A. thaliana* primary roots, acidins responded rapidly and reversibly to *in vivo* pH changes, and allowed the fine measurement of pH in the transition zone with regard to cell elongation and the gravitropic response. Surprisingly, while PM-associated acidins were distributed evenly in the cell periphery, the freely diffusing forms exclusively accumulated in pockets between cells, suggesting a heterogenous apoplastic environment that, for pavement cells, is also associated with pH variability. Our study therefore presents three new sensors that can be used to explore *in* vivo apoplastic pH variation with regards to cell elongation, a highly dynamic process.

Materials and methods

Constructs

An optimized version of TagBFP2 for plant and *E. coli* codon usage (Subach *et al.*, 2011) was synthesized by GenCust. Fluorescent proteins were obtained using previously published sequences for SYFP2 (Kremers *et al.*, 2006), mRFP1 (Campbell *et al.*, 2002), and Gamillus (Shinoda et al., 2018), in which the two predicted N-glycosylation sites were removed by point mutation (N129Q and N213Q). To make the acidin tandems, the mRFP1 sequence was fused at its N-terminus to TagBFP2 for acidin2, Gamillus for acidin3, and SYFP2 for acidin4, along with a small linker several amino acids in length (Gly-Ser for acidin2, and Ala-Val-Asn-Ala for acidin3 and acidin4). The Apo and PM-Apo acidins were generated as previously described (Martinière *et al.*, 2018), except for the signal peptide from LuPME1 (Al-Qsous *et al.*, 2004) that was used for the Apo versions. Sensors were assembled using the Golden Braid cloning method (Sarrion-Perdigones *et al.*, 2013) and were placed under the control of either a 35S promoter or the UBQ10 promoter (Grefen *et al.*, 2010). For production in *E. coli*, a HIS-tag was added at the N-terminus of the acidins by cloning the coding sequence between the Nco1 and Xho1 sites of pRset B in place of pHluorin (Martinière *et al.*, 2018).

Plant material

For expression in plants, acidin constructs were introduced in the *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105 that was used either for infiltration of 4-week-old *Nicotiana tabacum* cv. SR1 leaves as previously described (Brandizzi *et al.*, 2002), or to generate *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia-8 stable transformants according to the floral dip method (Clough and Bent, 1998).

In vitro characterization and calibration

After production in *E. coli* (strain BL21 PlysS), the recombinant acidins were purified in a nickel column following the manufacturer's instructions. Different sets of 100 mM pH buffers were used for *in vitro* and *in situ* calibration, including: acetic acid/glycine for pH 2.5 and 3; acetic acid/Bis-tris propane (BTP) for pH values from 3.5 to 5; 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES)/BTP for pH values from 5.5 to 6.5; and 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)/BTP for pH values from 7 to 8.5. The *in vitro* characterization was performed on a Xenius spectrofluorometer (SAFA) with purified recombinant acidins diluted 1/1000 in pH buffers and the following settings: 405 nm Exc./450-500 nm Em. for TagBFP2; 476 nm Exc./504-550 nm Em. for Gamillus; 561 nm Exc./580 to 650 nm Em. for mRFP; and 488 nm Exc./510-554 nm Em. for SYFP2. For *in situ* calibration under the confocal microscope, 5 µl of purified acidin diluted 1/10 to 1/20 with the pH buffers were applied on a coverslip and imaged with the same settings used for plant material imaging. For *in vivo* calibration, MS/2 medium was added to the plant material with 100 mM glycine HCl for pH 2 and 3, or 100 mM MES KOH for pH 4, 5 and 6. The obtained ratios (561/405 for acidin2, 561/476 for acidin3 and 488/561 for acidin4) were plotted as a function of pH with a Boltzmann equation to fit sigmoidal curves using the GraphPad Prism software as previously described (Martinière *et al.*, 2013).

Immunoblot and immunofluorescence

For western blot analysis, the acidins were detected using anti-RFP antibodies (6G6, Chromotek 1/2000). The orientation of the PM-Apo versions was confirmed by immunofluorescence on intact tobacco protoplasts as previously described (Martinière *et al.*, 2012). The fusion PIP2.1-mCherry was used as a negative control, and the red fluorescent protein was detected with anti-DsRed antibodies (Takara 1/500) and anti-rabbit Alexa Fluor 488 F(ab)'2 antibodies (Fisher 1/500).

172

173 **Growing conditions**

174 Arabidopsis seeds were sterilized and stratified for 2 days prior to growth in half-strength MS
175 medium supplemented with 2.5 mM MES-KOH (pH 6), 1% sucrose and 0.8% agar (E type).
176 Plates were placed vertically in a growth chamber on a 16-h:8-h light:dark cycle at 21°C with
177 70% relative humidity and a light intensity of 200 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ for 4 days. Prior to observations,
178 plantlets were transferred on to microscopy slides covered with a thin layer (1-2 mm) of MS/2
179 and 0.8% phytagel, and were returned to the growth chamber for another 24 h.

180

181 **Confocal microscopy and epifluorescence ratio imaging**

182 At least one hour before imaging, the glass slide covered with medium was removed from the
183 plate, excess medium was removed, and a coverslip was placed on the root portion of the 5-
184 day-old seedlings.

185 Confocal observations were made with a Leica SP8 inverted microscope using a 40× water
186 objective (HCX Plan Apochromat CS 1.1 N.A.). We performed ratio imaging of acidins at 3%
187 405 nm and 2% 561 nm for acidin2, 1% 488 nm and 2% 561 nm for acidin3, 4% 514 nm and
188 2% 561 nm for acidin4, and 5% 476 nm and 12.5% 496 nm for pHluorin. Z-series were
189 generated with 1-µm steps to explore up to 20-50 µm in depth of the plant tissue. The xz
190 projection was calculated using Fiji software. For the gravitropsism response, plantlets on slides
191 were turned 90° for 30 min before imaging. The overall time that one plantlet remained in the
192 horizontal position for observation did not exceed 10 min.

193 Direct ratiometric imaging was performed using a Zeiss inverted fluorescent microscope
194 equipped with a shutter Lambda 10-B external wheel, by sequential illumination with a 10X/0.3
195 NA Plan Neofluoar objective. For acidin2, a LedHub source was used for excitation at 385 nm
196 or with a 550/20 filter; emission was collected with 480/40 and 600/50 emission filters for

TagBFP2 and mRFP, respectively. Images (binning 2 parameters) were acquired using a CDD camera (CoolSNAP HQ; Photometrics) with the MetaFluor ratio imaging software.

Statistics

For each condition or treatment, two biological replicates were made and 5-10 focal planes, images or time series were taken. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism software using the t-test ($P<0.05$ was considered to be a significant difference). Unless specified in the legend, data are expressed as mean ± SEM.

Results

The novel acidins are broad-range pH sensors

We generated three tandems of fluorescent proteins, RFP-TagBFP2, RFP-Gamillus and RFP-SYFP2, and named them acidin2, acidin3 and acidin4, respectively (Fig. 1). The sensors were produced in bacteria, purified, and characterized *in vitro* (Fig. S1). As expected, the two fluorescent proteins that compose a tandem differed in their response amplitudes to pH, as shown for the highest and lowest pH covered by the respective acidin (Fig. 1A-C), or for the entire range of analyzed pH levels (Fig. S2). For each acidin, the fluorescence ratio was calculated and plotted as a function of pH either before (Fig. S2D-F) or after normalization (Fig. 1D). The resulting curves fit a sigmoidal curve (R^2 ranging from 0.96 to 0.99) and cover a pH range from 3-6.5 (2.5 pH units below the pH coverage of pHluorin) with some overlap (Fig. 1D). We also tested *in vitro* the impact of other ions as well as the redox potential on the acidins and found little to no impact on acidins 2 and 4, although there was some effect for acidin3 regarding the type of cation (Fig. S3).

Next, we investigated the ability of the acidins to properly fold while in the plant secretory pathway, since many fluorescent proteins tend to be retained in the endoplasmic reticulum (ER). We chose to generate two apoplastic forms of acidins: one named PM-Apo (Fig. 2A-D), which is anchored in the PM thanks to a long TMD, as previously described (Martinière *et al.*, 2018); and Apo, a secreted form released into the external medium (Fig. 2E-I). After transient expression in tobacco epidermal cells, the different labelling patterns were observed by confocal microscopy. Similarly to the control pHluorin (Fig. 2Ad), the three PM-Apo acidins (Fig. 2Aa-c) were detected along the entire periphery of the cell. Acidins were correctly associated with the PM as expected (Fig. 2B) and were uncleaved, as shown by the exclusive localization at the PM after plasmolysis for both fluorescent proteins composing the sensor (Fig. 2C, arrow). The apoplastic orientation of the pH-sensing moiety of PM-Apo acidins was

supported by the type of amino acids composing the TMD (Lorent *et al.*, 2020). This was confirmed by immunofluorescence on intact protoplasts (Fig. 2D), since the RFP part of the acidin fusion (Fig. 2Da) was detected by antibodies on the outside of the protoplast (Fig. 2Db), while the negative control fusion made of the aquaporin PIP2.1 fused to a red fluorescent tag facing the cytosol (Fig. 2Dc) was not immunodetected (Fig. 2Dd). For the secreted Apo acidins, the fluorescence signal was detected in limited portions of the cells (Fig. 2Ea-c), as for the previously published pHluorin version (Fig. 2Ed, arrowhead) (Martinière *et al.*, 2018), with a covering that appears to decrease as sensor pKa increases. After plasmolysis, fluorescent signal from the two proteins composing the sensor (see schema in Fig. 2F) was detected in the entire space between cells (Fig. 2G-I) and not at the PM (arrow), supporting a release of the sensor in the apoplast. To conclude, the three acidins are correctly expressed and localized in plant cell apoplasts and are well-tolerated by the plant secretory pathway.

Next, we quantified the pH in tobacco epidermal apoplast using acidin2. Confocal images representative of the labelling pattern for PM-Apo and Apo fusions were selected (Fig. 3Aa and 3Ba, respectively). Relative variation in fluorescence for the two channels was observed along the cell periphery. To assess the existence of any imaging artefacts, we performed clamping at either pH 2.5 (Fig. 3b) or 6 (Fig. 3c). This was found to homogenize the fluorescence signal, suggesting that the observed variations of intensity are related to pH. We therefore calculated the pH in representative portions of labelling (Fig. 3Aa, 3Ba), from position 1 to position 2 and plotted the resulting values in Fig. 3Ad and 3Bd, respectively. As shown in Figure 3Ad, pH values measured at the PM using PM-Apo-Acidin2 (PM-Apo-Ac2) varied from pH 3 to almost 5. In contrast, pH measured from the released sensor Apo-Acidin2 (Apo-Ac2) varied from 4.5 to 5 (Fig. 3Bd). The pH analyzed from a larger pool of data confirmed a different distribution of pH between the two apoplastic sensors (Fig. 3Ae, Be), with an average pH of 3.50 ± 0.03

(n=568) for the PM-anchored sensor and pH 5.18 ± 0.03 (n=552) for a freely diffusing sensor (difference of $p<0.0001$ in an unpaired t-test).

Acidin allows the fine measurement of pH in growing roots

Since plant tissue growth is believed to involve local and transient acidification (Barbez *et al.*, 2017), research could benefit from sensors that are more sensitive in the acidic pH range, such as the acidins. For this, we generated stable Arabidopsis lines expressing PM-Apo and Apo acidins. With the exception of acidin3-expressing plants that presented some fluorescence mislocalization in the vacuole, acidin2- and acidin4-based sensors displayed clear and robust labelling, as shown for ratiometric images of primary roots expressing Apo-Ac2 (Fig. 4Aa) or PM-Apo-Ac2 (Fig. 4Ab). The corresponding longitudinal ratiometric profiles (Fig. 4Ac) showed an acidic zone at the level of the root cap (RC); an alkaline zone in the meristem; and a gradual acidification starting in the transition zone (TZ) that expands to the elongation zone (EZ), as expected from previously published data (Staal *et al.*, 2011). Growth media buffered at various pH values were successively applied to the seedlings while monitoring the fluorescence ratio in real-time. As shown in Figure S4A, the pH-related ratio in the TZ changed instantaneously, stabilized in less than one minute, and could be reversed (Supplemental Movie 1). The corresponding longitudinal ratiometric profiles at different pH levels were plotted in Figure 4Ad and compared. The effect of the applied pH on the ratio is even greater in the meristem and the TZ than in the EZ, which is also illustrated by the corresponding calibration curves (Fig. S4B and S4C, respectively). Interestingly, even when flattened, the curves fit a sigmoidal curve and presented a pKa close to that obtained *in vitro*, suggesting that the *in vivo* pH clamping was effective and allowed pH measurement in the apoplast of living primary roots ranging from 5.8 in the meristem to 4.5 in the EZ (Fig. 4Aa). Similar *in vivo* calibration on PM-Apo-Ac2 – expressing primary roots produced an even flatter curve in the TZ (Fig. S4D), with

an estimated pKa of 3.72. Since the pH estimated in the TZ of the primary root was at the upper limit of the acidin2 detection range, we switched to acidin4 to further analyze the zone where the ratiometric profile appears to cross the profile clamped at pH 5 (Fig. 4Ad, arrow). Gradual acidification was observed in a detailed confocal view covering the end of the TZ in Arabidopsis root expressing PM-Apo-Ac4 (Fig. 4Ba). We measured the pH along the longitudinal axis at the interface of two epidermal cell lines (Fig. 4Ba, arrows) and plotted the corresponding values (Fig. 4Bb). Three zones could be identified: Z1, starting from the end of the meristem up to where cells start to elongate and pH is stable (pH 5.17); Z2, where cells doubled their length as compared to their width, with a gradual pH acidification (average pH 4.97); and Z3, a zone where epidermal cells continued elongation with pH remaining stable at pH 4.68 (Fig. 4Bc). The link between root growth and apoplastic pH was also confirmed by applying a pH 3 buffer on PM-Apo-Acidin4 – expressing root, resulting in an instantaneous growth increase (Fig. S5, Supplemental Movie 2).

To test the ability of acidin to detect pH modification in auxin-related growth, we analyzed the pH upon eliciting a gravitropism response in PM-Apo-Acidin4 primary roots (Fig. 4C). As described in previous reports (Monshausen *et al.*, 2011; Barbez *et al.*, 2017), we observed a significant alkalinization of the root tip inner face when compared to the outer face (pH 5.35 versus pH 5.2, $p<0.0001$; Fig. 4Cc) or the control root tip (pH 5.29 on both faces).

The apoplast contains pH subdomains

Upon careful inspection of the fluorescence pattern for PM-Apo – expressing epidermal cells, we found a combination of magenta and cyan signal that varied with the focal plan. We collected z-series covering the entire thickness of the epidermis and performed a z projection (Figure 5). While a predominance of TagBFP2 signal (cyan) was found in the anticlinal portion of the epidermis (Fig. 5Aa, star), more mRFP signal (magenta) was found in the periclinal

regions for PM-anchored acidin (Fig. 5Aa). These ratio variations are most likely due to pH variations in the z direction, as clamping at either acidic pH (Fig. 4Ab) or alkaline pH (Fig. 4Ac) led to signal homogeneity in the z dimension.

In contrast to PM-Apo, Apo acidins were detected almost exclusively in some curved portion of the cells, and the magenta signal dominated with little heterogeneity (Fig. 4Ba). The z projection analysis revealed that fluorescence signal was restricted to the periclinal portion of the apoplast. Even after clamping at an optimal pH for acidin2 (pH 4.5), no signal was detected in the anticlinal portion of the cell layer (Fig. 5Bb, star). A similar distribution was obtained using a pHluorin version of Apo that can only be detected in the periclinal wall, before and after clamping at pH 8 (Fig. S6). This suggests that the uneven distribution of fluorescence signal for Apo sensors was not due to pH but to other features of the cell wall that limit sensor diffusion. To examine whether this heterogeneous distribution of acidin sensors is shared with Arabidopsis, we observed cotyledons 2 to 3 days after germination and found the same patterns of distribution (Fig. S7). We also generated a z-series from Arabidopsis root tip comprising half of the root thickness for PM-Apo-Ac4 (Fig. 6A) or Apo-Ac2 (Fig. 6B and Supplemental Movie 3) seedlings. In contrast to PM-Apo, the Apo labelling was more discontinuous and appeared to be concentrated in pockets that were clearly visible in the z projection (Fig. 6Bd). With the exception of the region covered by the root cap (Supplemental Movie 3), no signal was detected at the surface of the epidermis, suggesting that the sensors diffused away from the root.

Altogether, the distinct distribution of freely diffusing and PM-anchored acidins suggests that the apoplast is a complex environment. Furthermore, in the case of pavement cells, there is a gradual acidification from the surface of the epidermis towards the internal, anticlinal region.

Discussion

In this work, we described and extensively characterized the novel genetically encoded bimolecular fluorescent sensors acidin2, acidin3 and acidin4, which were designed to extend our ability to monitor pH towards the acidic range in living tissue. We chose to assemble two fluorescent proteins in tandem with low but different pKa values, to ensure that they would not be equally affected by low pH while remaining fluorescent. Indeed, this is what was observed on purified acidins, allowing the acquisition of typical sigmoid ratiometric pH curves. Interestingly, the pKa of the acidins observed *in vitro* turned out to be very close to the mean of the known pKa of the two fluorescent proteins composing the tandem, suggesting that this approach could be expanded to other fluorescent proteins with low pKa. The robustness of measuring pH using an *in situ* calibration method with purified acidin was effectively illustrated by *in vivo* calibration on Arabidopsis root tips expressing acidin2 free in the apoplast (Fig. 4Ad), where the pKa (3.41) in the TZ (Fig. S4B) is very close to the pKa measured by *in vitro* calibration (3.86). Altogether, the three acidins covered a range of pH that extended 2.5 pH units below the minimum of most available fluorescent pH probes, including pHluorin, with an interesting overlap. Although acidin3 was capable of functioning *in vitro*, its partial vacuolar localization *in planta* (Fig. 2Eb) suggests a trafficking problem in the plant secretory pathway. Since acidin2 and acidin4 were well-tolerated, this could be due to some structural features of Gamillus, which have only been tested in human cells so far (Shinoda *et al.*, 2018), or to the removal of N-glycosylation sites that was performed in this work (*cf.* Methods).

The large majority of pH values that we measured in Arabidopsis root tips using our acidin sensors were in the range of pH 4.5 to 5.5. The most acidic pH we monitored in roots was apoplastic pH, just below the cap cell layer, at pH 4.3. This fits well with previously published data using either HPTS (Barbez *et al.*, 2017) or Oregon Green coupled to a cellulose-binding domain (Fasano *et al.*, 2001). Importantly, we did not observe any buffering effect of the sensor itself, as demonstrated by the fact that in the primary root TZ the pH of acidin2- and acidin4-

based fusions is approximately pH 5. Our results support the hypothesis that a decrease of half a pH unit is sufficient for switching to an elongating status. Three zones were identified in the distal meristem, based on their pH profile: Z1, where pH was stable at 5.17; Z2, where gradual pH acidification was observed (average pH 4.97); and Z3, where pH remained stable at pH 4.68 (Fig. 4B). Interestingly, the acidification zone Z2 is narrow (less than 100 µm) and corresponds to cells that are already twice as long as they are wide, suggesting that acidification in the apoplast occurs after elongation has already begun, as previously published using HPTS (Barbez *et al.*, 2017). Although it is clear that apoplastic pH is linked to cell elongation, this appears to contradict the chronology of the acid growth theory, a model mainly supported by experiments on aerial tissue (Fendrych et al., 2016), in which cell wall acidification triggers a cascade of events that ultimately lead to cell wall loosening and subsequent cell elongation. Further analysis of the chronology between acidification and elongation will require monitoring pH from single cells, which could be achieved by expressing the acidins under cell line-specific promoters (Marquès-Bueno *et al.*, 2016) and dynamic imaging, since pH is known to oscillate in primary roots (Monshausen *et al.*, 2011). The fast and reversible reactivity of acidins also makes them promising as monitors of physiological events associated with fast and massive acidification of the apoplast, such as during gravitropism (Monshausen *et al.*, 2011), or upon contact with a *Fusarium oxysporum* elicitor in roots (Kesten *et al.*, 2019). It could also be interesting to use the acidins in highly acidic environments, such as in grape berries where pH values can be as low as 2.5 at the green stage (Fontes *et al.*, 2011).

In this work, we localized our sensors to the apoplast either in a freely diffusing form (Apo) or anchored in the PM (PM-Apo) and we obtained different distribution patterns (Fig. 7). The ability of the Apo form to diffuse is supported by the fact that the outer face of the epidermis is labelled only when a cuticle is present (Fig. 7B), i.e. in pavement cells or in the root cap (Berhin *et al.*, 2019). Still, some areas of the apoplast remained unlabeled, including the anticlinal

region of the leaf epidermis. One possible explanation for the uneven distribution of Apo is a limited diffusion due to heterogeneity in cell wall porosity. This hypothesis is supported by the size of the acidins, assuming they are globular proteins (53 Å), as compared to the estimated size of the pores (30-50 Å; Carpita et al., 1979). Recently, the heterogeneity of apoplast porosity in pavement cells was also supported by results from elegant tools designed to monitor microviscosity, using boron-dipyrromethene (BODIPY)-based rigidochromic molecular rotors that were localized to the PM or to the cell wall (Michels *et al.*, 2020). Previous observations that microviscosity decreases in the pectin-impaired mutant *quasimodo* (Michels *et al.*, 2020) and that BSA diffusion in cell walls depends on the degree of pectin methylation (Willats *et al.*, 2001) support the hypothesis that Apo diffusion could be affected by cell wall composition. In contrast to Apo, the PM-Apo is evenly distributed in the cell periphery but does show heterogeneity in pH in tobacco leaf pavement cells as well as in Arabidopsis cotyledons, as previously described using HPTS (Barbez *et al.*, 2017). In both tissues, the pH in the anticlinal region is more acidic than in the periclinal region (Fig. 7A). This could be related to the extreme complexity of jigsaw cell growing processes, where variation in relative growth rates has been observed in leaves (Elsner *et al.*, 2018) as well as in cotyledons (Armour *et al.*, 2015).

Our results therefore highlight an unexpected complexity of the apoplast, with the existence of pH subdomains and an important restriction of acidin labelling when released into the apoplast, most likely in relation to the cell wall composition. These results intriguingly suggest that Apo could be useful for monitoring pH in a subpopulation of the pectin cell wall, in relation to cell shape determination (Altartouri *et al.*, 2019; Haas *et al.*, 2020). The possibility of assessing apoplastic pH at a cellular resolution with PM-anchored acidin will open new perspectives in the study of the acid growth theory in root tissue.

Supplementary data

Figure S1: Western blot analysis of the acidins

After production in *E. coli* and purification, acidin proteins were separated by 10% SDS PAGE electrophoresis, and transferred onto nitrocellulose. The resulting membrane was immunolabelled with anti-RFP antibodies. The presence of strong bands of the expected size (52-54 kDa) for acidin2 (lane1), acidin3 (lane 2), and acidin4 (lane 3) suggests that the sensors produced were uncleaved.

Figure S2: Dynamics of acidin fluorescence as a function of pH

Acidins produced in *E. coli* and then purified were diluted in buffers of different pH and were analyzed by spectrofluorometry.

A-C: Emission profiles of Acidin2 (A), Acidin3 (B), and Acidin4 (C) at various pH levels.

D-G: Calibration curves of the three acidins, represented as fluorescence ratios mRFP/TagBFP2 (D), mRFP/Gamillus (E), SYFP2/mRFP (F) and 496nm/476 nm (G), and as a function of pH; n = 5 for Acidin2 and Acidin3, n = 10 for Acidin4, and n = 1 for pHluorin.

Figure S3: **Impact of ionic and redox environments on acidin fluorescence properties**

A: Emission spectra of Acidin2 (a), Acidin3 (b) and Acidin4 (c) in 100 mM MES-BTP buffer pH 6 containing either 100 mM KCl, 100 mM NaCl, or 100 mM $CaCl_2$.

B: Emission spectra of Acidin2 (a), Acidin3 (b) and Acidin4 (c) in 100 mM acetic acid-BTP, 10 mM KCl, 2 mM $CaCl_2$ buffer at pH 5 supplemented with either 1 mM DTT (control) or 2 mM H_2O_2.

Figure S4: **Real-time response to pH in Arabidopsis primary root tip**

Five-day-old Arabidopsis seedlings expressing Apo-Acidin2 (A-C) or PM-Apo-Acidin2 (D)

were observed by ratiometric microscopy.

A: mRFP/TagBFP2 fluorescence ratio in the transition zone over time, after perfusion with unbuffered MS/2, and successively with MS/2 buffered at various pH levels (100 mM glycine-HCl for pH 2 and pH 3 or 100 mM MES-KOH 0.1M for pH 4 to pH 6). See also Supplemental Movie 1.

B: *In vivo* calibration curves obtained from the transition zone (B) and the elongation zone (C) of Apo-Acidin2, or from the transition zone of the PM-Apo-Acidin2 (D) root tip.

Figure S5: Acidic pH triggers a fast increase in root growth

5- to 6-day-old Arabidopsis seedlings expressing Apo-Acidin2 were observed by ratiometric microscopy.

A: Ratiometric image of the root tip at t0 (see corresponding Supplemental Movie 2) in unbuffered MS/2.

B: Kymograph of the root tip in A before and after (star) application of MS/2 100 mM glycine-HCl pH 3 buffer.

The increase in pH is indicated by the color gradient.

Figure S6: **pH clamping on tobacco cells expressing freely diffusing pHluorin (Apo)**

Clamping results indicate that the signal in the anticlinal region is not detected, even at alkaline pH. Tobacco epidermal cells transiently expressing the sensor Apo-pHluorin were untreated (A and B) or incubated with 40 µM nigericin, 150 mM KCl and 50 mM HEPES pH 8 to clamp the pH (C and D). All observations were performed under a confocal microscope.

A and C: Images from a z-series of a portion of cells expressing Apo-pHluorin that was projected in z (B and D).

False color: cyan for Exc476 signal and magenta for Exc496 signal. The increase in pH is

indicated by the color gradient. Star: position of the middle of the epidermal layer.

Figure S7: Fluorescence pattern in cotyledon pavement cells

Arabidopsis seedlings expressing either PM-Apo-Acidin2 (A) or Apo-Acidin2 (B) in the cotyledon at 2 to 3 days after germination were observed by confocal microscopy. A series of confocal images were taken through the thickness of the epidermis and a z projection was performed in a selected region marked by the yellow line.
Cyan: TagBFP2 signal. Magenta: mRFP signal. The increase in pH is indicated by the color gradient. Scale bar: 10 µm.

Supplemental Movie 1: Effect of sequential pH changes (no buffer, pH 6, pH 5, pH 4, pH 3, pH 2, pH 6) on 5- to 6-day-old seedlings expressing Apo-Ac2. Total movie length: 6 min. The increase in pH is indicated by the color gradient (purple to yellow).

Supplemental Movie 2: Effect on acidic pH (pH 3) on 5- to 6-day-old seedlings expressing Apo-Ac2. Total movie length: 15 min. The increase in pH is indicated by the color gradient (purple to yellow).

Supplemental Movie 3: Z-series of an Arabidopsis root tip expressing Apo-Ac2. Cyan: TagBFP2 signal. Magenta: mRFP signal.

Acknowledgments

This work was funded by the Homeowall project from the Agence Nationale de la Recherche (ANR), INRAE and Occitanie region for PhD grant for HM. We thank the « plateforme d'histocytologie et d'imagerie cellulaire végétale » (PHIV) and Montpellier ressources

imagerie (MRI) platform for access to microscopes.

Bibliography

Al-Qsous S, Carpentier E, Klein-Eude D, Burel C, Mareck A, Dauchel H, Gomord V, Balangé AP. 2004. Identification and isolation of a pectin methylesterase isoform that could be involved in flax cell wall stiffening. Planta **219**, 369–378.

Altartouri B, Bidhendi AJ, Tani T, Suzuki J, Conrad C, Chebli Y, Liu N, Karunakaran C, Scarcelli G, Geitmann A. 2019. Pectin Chemistry and Cellulose Crystallinity Govern Pavement Cell Morphogenesis in a Multi-Step Mechanism. Plant Physiology **181**, 127–141.

Amano Y, Tsubouchi H, Shinohara H, Ogawa M, Matsubayashi Y. 2007. Tyrosine-sulfated glycopeptide involved in cellular proliferation and expansion in Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences **104**, 18333–18338.

Armour WJ, Barton DA, Law AMK, Overall RL. 2015. Differential Growth in Periclinal and Anticlinal Walls during Lobe Formation in Arabidopsis Cotyledon Pavement Cells. The Plant Cell **27**, 2484–2500.

Barbez E, Dünser K, Gaidora A, Lendl T, Busch W. 2017. Auxin steers root cell expansion via apoplastic pH regulation in Arabidopsis thaliana. Proceedings of the National Academy of Sciences **114**, E4884–E4893.

Berhin A, de Bellis D, Franke RB, Buono RA, Nowack MK, Nawrath C. 2019. The root cap cuticle: a cell wall structure for seedling establishment and lateral root formation. Cell **176**, 1367-1378.e8.

Brandizzi F, Frangne N, Marc-Martin S, Hawes C, Neuhaus J-M, Paris N. 2002. The Destination for Single-Pass Membrane Proteins Is Influenced Markedly by the Length of the Hydrophobic Domain. The Plant Cell **14**, 1077–1092.

Burgstaller S, Bischof H, Gensch T, *et al.* 2019. pH-Lemon, a fluorescent protein-based pH reporter for acidic compartments. ACS sensors **4**, 883–891.

Campbell RE, Tour O, Palmer AE, Steinbach PA, Baird GS, Zacharias DA, Tsien RY. 2002. A monomeric red fluorescent protein. Proceedings of the National Academy of Sciences **99**, 7877–7882.

Carpita N, Sabularse D, Montezinos D, Delmer DP. 1979. Determination of the pore size of cell walls of living plant cells. Science **205**, 1144–1147.

Clough SJ, Bent AF. 1998. Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation ofArabidopsis thaliana. The Plant Journal **16**, 735–743.

Dragwidge JM, Scholl S, Schumacher K, Gendall AR. 2019. NHX-type Na+(K+)/H+ antiporters are required for TGN/EE trafficking and endosomal ion homeostasis in Arabidopsis thaliana. Journal of Cell Science **132**.

Elsner J, Lipowczan M, Kwiatkowska D. 2018. Differential growth of pavement cells of Arabidopsis thaliana leaf epidermis as revealed by microbead labeling. American Journal of Botany **105**, 257–265.

Fasano JM, Swanson SJ, Blancaflor EB, Dowd PE, Kao T, Gilroy S. 2001. Changes in root cap pH are required for the gravity response of the Arabidopsis root. The Plant Cell **13**, 907–921.

Fendrych M, Leung J, Friml J. 2016. TIR1/AFB-Aux/IAA auxin perception mediates rapid cell wall acidification and growth of Arabidopsis hypocotyls (G Stacey, Ed.). eLife **5**, e19048.

Fontes N, Gerós H, Delrot S. 2011. Grape Berry Vacuole: A Complex and Heterogeneous Membrane System Specialized in the Accumulation of Solutes. American Journal of Enology and Viticulture **62**, 270–278.

Fuglsang AT, Kristensen A, Cuin TA, *et al.* 2014. Receptor kinase-mediated control of primary active proton pumping at the plasma membrane. The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology **80**, 951–964.

Geilfus C-M, Mühling KH. 2012. Transient alkalinization in the leaf apoplast of Vicia faba L.

depends on NaCl stress intensity: an in situ ratio imaging study. Plant, Cell & Environment **35**, 578–587.

Gjetting SK, Mahmood K, Shabala L, Kristensen A, Shabala S, Palmgren M, Fuglsang AT. 2020. Evidence for multiple receptors mediating RALF-triggered Ca2+ signaling and proton pump inhibition. The Plant Journal **104**, 433–446.

Gjetting SK, Ytting CK, Schulz A, Fuglsang AT. 2012. Live imaging of intra- and extracellular pH in plants using pHusion, a novel genetically encoded biosensor. Journal of Experimental Botany **63**, 3207–3218.

Grefen C, Donald N, Hashimoto K, Kudla J, Schumacher K, Blatt MR. 2010. A ubiquitin-10 promoter-based vector set for fluorescent protein tagging facilitates temporal stability and native protein distribution in transient and stable expression studies. The Plant Journal **64**, 355–365.

Haas KT, Wightman R, Meyerowitz EM, Peaucelle A. 2020. Pectin homogalacturonan nanofilament expansion drives morphogenesis in plant epidermal cells. Science **367**, 1003–1007.

Han J, Burgess K. 2010. Fluorescent indicators for intracellular pH. Chemical Reviews **110**, 2709–2728.

Kesten C, Gámez-Arjona FM, Menna A, *et al.* 2019. Pathogen-induced pH changes regulate the growth-defense balance in plants. The EMBO Journal **38**, e101822.

Kremers G-J, Goedhart J, van Munster EB, Gadella TWJ. 2006. Cyan and Yellow Super Fluorescent Proteins with Improved Brightness, Protein Folding, and FRET Förster Radius,. Biochemistry **45**, 6570–6580.

Lorent JH, Levental KR, Ganesan L, Rivera-Longsworth G, Sezgin E, Doktorova M, Lyman E, Levental I. 2020. Plasma membranes are asymmetric in lipid unsaturation, packing and protein shape. Nature Chemical Biology **16**, 644–652.

Luo Y, Scholl S, Doering A, *et al.* 2015. V-ATPase activity in the TGN/EE is required for exocytosis and recycling in Arabidopsis. Nature Plants **1**, 1–10.

Marquès-Bueno MM, Morao AK, Cayrel A, Platre MP, Barberon M, Caillieux E, Colot V, Jaillais Y, Roudier F, Vert G. 2016. A versatile Multisite Gateway-compatible promoter and transgenic line collection for cell type-specific functional genomics in Arabidopsis. The Plant Journal **85**, 320–333.

Martinière A, Bassil E, Jublanc E, Alcon C, Reguera M, Sentenac H, Blumwald E, Paris N. 2013. In vivo intracellular pH measurements in tobacco and Arabidopsis reveal an unexpected pH gradient in the endomembrane system. The Plant Cell **25**, 4028–4043.

Martinière A, Gibrat R, Sentenac H, Dumont X, Gaillard I, Paris N. 2018. Uncovering pH at both sides of the root plasma membrane interface using noninvasive imaging. Proceedings of the National Academy of Sciences **115**, 6488–6493.

Martinière A, Lavagi I, Nageswaran G, *et al.* 2012. Cell wall constrains lateral diffusion of plant plasma-membrane proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences **109**, 12805–12810.

Michels L, Gorelova V, Harnvanichvech Y, Borst JW, Albada B, Weijers D, Sprakel J. 2020. Complete microviscosity maps of living plant cells and tissues with a toolbox of targeting mechanoprobes. Proceedings of the National Academy of Sciences **117**, 18110–18118.

Miesenböck G, De Angelis DA, Rothman JE. 1998. Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. Nature **394**, 192–195.

Monshausen GB, Miller ND, Murphy AS, Gilroy S. 2011. Dynamics of auxin-dependent Ca2+ and pH signaling in root growth revealed by integrating high-resolution imaging with automated computer vision-based analysis. The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology **65**, 309–318.

Pearce G, Moura DS, Stratmann J, Ryan CA. 2001. RALF, a 5-kDa ubiquitous polypeptide

in plants, arrests root growth and development. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**, 12843–12847.

Peters WS, Felle HH. 1999. The correlation of profiles of surface pH and elongation growth in Maize roots. Plant Physiology **121**, 905–912.

Rayle DL, Cleland RE. 1992. The Acid Growth Theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. Plant Physiology **99**, 1271–1274.

Sarrion-Perdigones A, Vazquez-Vilar M, Palací J, Castelijns B, Forment J, Ziarsolo P, Blanca J, Granell A, Orzaez D. 2013. GoldenBraid 2.0: A Comprehensive DNA Assembly Framework for Plant Synthetic Biology. Plant Physiology **162**, 1618–1631.

Shimizu Y, Takagi J, Ito E, *et al.* 2021. Cargo sorting zones in the trans -Golgi network visualized by super-resolution confocal live imaging microscopy in plants. Nature Communications **12**, 1901.

Shinoda H, Ma Y, Nakashima R, Sakurai K, Matsuda T, Nagai T. 2018. Acid-Tolerant Monomeric GFP from Olindias formosa. Cell Chemical Biology **25**, 330-338.e7.

Staal M, Cnodder TD, Simon D, Vandenbussche F, Straeten DVD, Verbelen J-P, Elzenga T, Vissenberg K. 2011. Apoplastic alkalinization is instrumental for the inhibition of cell elongation in the Arabidopsis root by the ethylene precursor 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. Plant Physiology **155**, 2049–2055.

Subach OM, Cranfill PJ, Davidson MW, Verkhusha VV. 2011. An Enhanced Monomeric Blue Fluorescent Protein with the High Chemical Stability of the Chromophore. PLOS ONE **6**, e28674.

Willats WGT, Orfila C, Limberg G, *et al.* 2001. Modulation of the degree and pattern of methyl-esterification of pectic homogalacturonan in plant cell walls. Journal of Biological Chemistry **276**, 19404–19413.

Legends

Figure 1: Schematic representation and *in vitro* characterization of acidins

Acidin2 (A), acidin3 (B) and acidin4 (C) are genetically encoded tandems of fluorescent proteins made with mRFP (pKa 4.5) fused respectively to TagBFP2 (pKa 2.7), Gamillus (pKa 3.4), or SYFP2 (pKa 6). The acidins were produced in *E. coli*, purified, and analyzed by spectrofluorometry.

A-C: Emission profiles of the fluorescent proteins in acidins at the highest (dashed line) or lowest pH (solid line) expressed in arbitrary units relative to the optimum.

D: Normalized *in vitro* calibration curves of acidins in comparison to pHluorin, fit with sigmoidal curves (acidin2: $R^2 = 0.97$, pKa = 3.86; acidin3: $R^2 = 0.96$, pKa = 4.49; acidin4: $R^2 = 0.99$, pKa = 5.63; and pHluorin: $R^2 = 0.99$, pKa = 6.79).

Figure 2: Characterization of acidins in tobacco epidermal cells

Tobacco epidermal cells were transiently transformed with pH sensors either anchored in the PM (A-D) or released in the apoplast (E-I). Cells were then analyzed after three days of expression with a confocal microscope.

A and E: Expression pattern of either PM-Apo (A) or Apo (F) with acidin2 (a), acidin3 (b), acidin4 (c), or pHluorin (d).

B and F: Schematic representation of the acidin fusion protein PM-Apo (B) or Apo (F).

C, G-I: Cells expressing either PM-Apo-Acidin2 (C), Apo-Acidin2 (G), Apo-Acidin3 (H) or Apo-Acidin4 (I) were submitted to plasmolysis with NaCl 2% for 30 min prior to observation.

D: Living tobacco protoplasts expressing either PM-Apo-Acidin2 (a and b) or the PM protein aquaporin PIP2.1 tagged on its cytoplasmic side with mCherry (c and d) were immunolabelled with rabbit primary anti-DsRed antibodies and secondary anti-rabbit Alexa Fluor 488 F(ab)'2 antibodies. In red (a and c): fluorescence emitted from either mRFP (a) or mCherry (c). In green

(b and d): fluorescence signal resulting from immunolabelling was detected only for the PM-Apo-Acidin2 fusion (b), confirming the exposure of mRFP on the outside of the protoplast. Cyan: fluorescence signal from TagBFP for acidin2, Gamillus for acidin3, SYFP2 for acidin4, or 476Exc for pHluorin. Magenta: fluorescence signal from mRFP for the acidins, or the 496Exc channel for pHluorin. Arrowhead: labeled apoplast. Arrow: PM. Scale bar: 10 µm.

Figure 3: pH distribution in tobacco epidermis expressing acidin2

Tobacco leaves were transiently transformed with PM-Apo-Acidin2 (A) or Apo-Acidin2 (B) and observed after 3 days with a confocal microscope. (a-c): Detail of cells with a typical pattern in water or after 45 min clamping with 20 µM nigericin in pH 2.5 buffer (b) or pH 6 buffer (c). (d): Distribution of pH in the portion of labelled apoplasts from position 1 to position 2 along the cell periphery. (e): Histograms of pH distribution constructed for PM-Apo-Acidin2 (A, n=568) or Apo-Acidin2 (B, n=552). False color: cyan for TagBFP2 signal and magenta for mRFP signal. Scale bar: 10 µm.

Figure 4: pH variations monitored in living Arabidopsis primary root expressing acidins are associated with cell elongation

Arabidopsis plants were stably transformed with acidins targeted to the apoplast, and fluorescence was observed in the primary roots of 5- to 6-day-old seedlings using ratiometric imaging for acidin2 (A) or a confocal microscope for acidin4 (B and C).

A: Analysis of pH in the first 400 µm (apical part) of primary root tips expressing either Apo-Acidin2 (a, c and d) or PM-Apo-Acidin2 (b and c). (a and b): Ratiometric images in false color with estimated pH (a) from *in vivo* calibration. (c): Typical ratiometric profiles, with high values corresponding to high pH (n = 7 for Apo-Acidin2 and n = 3 for PM-Apo-Acidin2). (d): The absolute ratio of a typical Apo-Acidin2 root tip in unbuffered MS/2 (black) was superposed

with profiles of the same root after equilibration with MS/2 medium buffered successively at pH 6 (green), pH 5 (pink) and pH 4 (blue). Arrow: the region in which the MS/2 profile crosses the buffered profile at pH 5.

B: Ratiometric image from a 300-µm portion of the epidermis in the transition zone of a primary root tip expressing PM-Apo-Acidin4 (a) and the corresponding pH profile (b) from the intercellular portion delimited by arrows in (a). (c): Measures of pH in the three zones identified in b (pH_{Z1} = 5.17, n = 2,971; pH_{Z2} = 4.97, n = 2,102; pH_{Z3} = 4.68, n = 2,675).

C: Ratiometric images of root tips from 5- to 6-day-old seedlings expressing PM-Apo-Acidin4 maintained in normal conditions (a) or submitted to a 90° rotation for 25 to 30 min (b). (c): pH measured in the epidermal cell layer at the outer and inner sides of the root after gravistimulation or at the left and right sides for the control root (n = 1,022 to 1,328).

RC: root cap; TZ: transition zone: EZ: elongation zone. Scale bar: 10 µm. The increase in pH is indicated by the color gradient.

Figure 5: Acidins reveal the existence of apoplastic subdomains with different pH values in tobacco epidermal cells

Tobacco leaves transiently transformed with the sensor PM-Apo-Acidin2 (A) or Apo-Acidin2 (B) were observed under a confocal microscope: in untreated conditions (a); after incubation for 30 to 45 min with 20 µM nigericin, 150mM KCl with 50mM acetate-BTP pH 4.5 (b); or with MES-BTP pH 6.5 (c). Series of confocal images were taken through the thickness of the epidermis and a z projection was performed in the portion of the image indicated by a yellow line.

False color: cyan for TagBFP2 signal and magenta for mRFP signal. Stars indicate the middle of the epidermal layer. Scale bar: 10 µm.

Figure 6: Freely diffusing acidin is concentrated in internal pockets between cell layers

Primary root tips from 5- to 6-day-old Arabidopsis seedlings expressing PM-Apo-Acidin4 (Aa-Ac) or Apo-Acidin2 (Ba, Bb and Bd) were observed with a confocal microscope.

(Aa and Ab) Confocal images at a focal plane in the median section with high (a) or low laser power (b). (Ac) Z projection in the transition zone of a PM-Apo-Acidin4 root or an untransformed root at the same settings (Ad). (Ba and Bb) Confocal images at two different focal planes of the same root; see also Supplemental Movie 3 for the entire z-series. (Bc) pH measured with Apo-Acidin2: in the transition zone (TZ), pH 4.89 (n=100); in the root cap (RC), pH 4.3 (n=123); or after clamping at pH 3 (n=31). (Bd) Z projection in the transition zone of Apo-Acidin2 root or untransformed root at the same settings (Be).

e: epidermis; c: cortex. Scale bar: 10 µm.

Figure 7: Model for apoplastic subdomains

Schematic z projection of fluorescence labelling in pavement cell epidermis (A) or primary root (B) for PM-anchored (PM-Apo) and freely diffusing (Apo) forms of apoplastic fusions. In pavement cells (A), PM-Apo labels the entire thickness of the epidermal PM while Apo is restricted to the periclinal part of the apoplast, which appears more alkaline than the anticlinal part. In Arabidopsis primary root tips (B), PM-Apo equally labels all cell layers, while Apo is accumulated in pockets between cells and can be detected at the surface of the epidermis only when the root cap cell layer is present.

c.: cap cell layer; epi.; epidermis; co.: cortex.

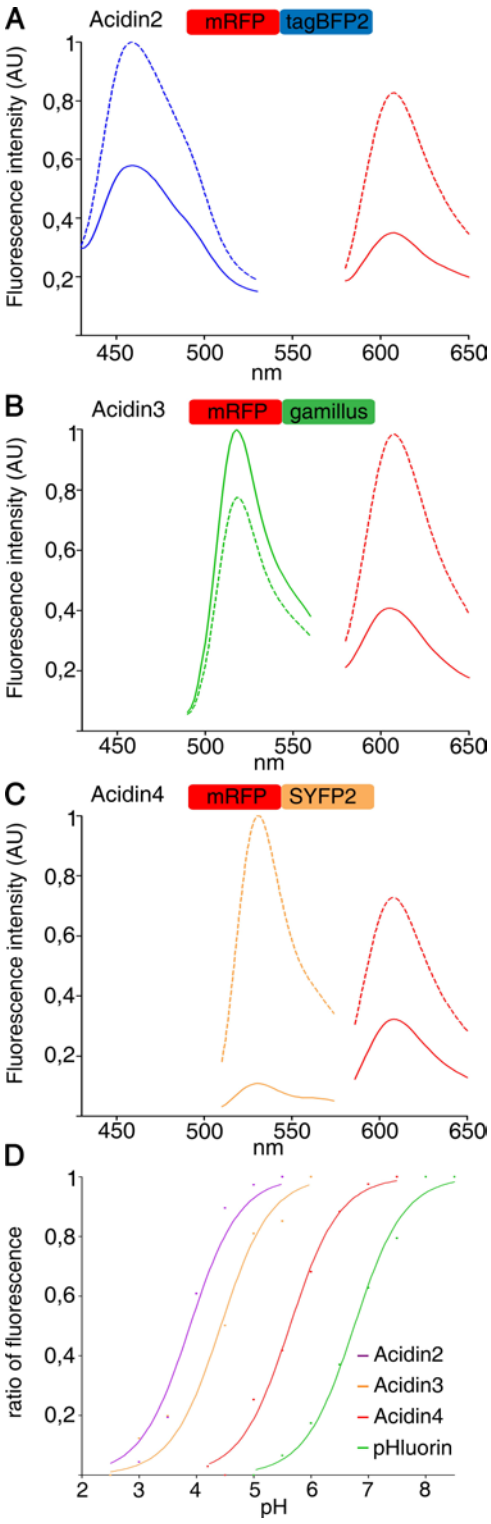


Figure 1: Schematic representation and *in vitro* characterization of acidins
Acidin2 (A), acidin3 (B) and acidin4 (C) are genetically encoded tandems of fluorescent proteins made with mRFP (pKa 4.5) fused respectively to TagBFP2 (pKa 2.7), Gamillus (pKa 3.4), or SYFP2 (pKa 6). The acidins were produced in *E. coli*, purified, and analyzed by spectrofluorometry.
A-C: Emission profiles of the fluorescent proteins in acidins at the highest (dashed line) or lowest pH (solid line) expressed in arbitrary units relative to the optimum.
D: Normalized *in vitro* calibration curves of acidins in comparison to pHluorin, fit with sigmoidal curves (acidin2: R^2 = 0.97, pKa = 3.86; acidin3: R^2 = 0.96, pKa = 4.49; acidin4: R^2 = 0.99, pKa = 5.63; and pHluorin: R^2 = 0.99, pKa = 6.79).

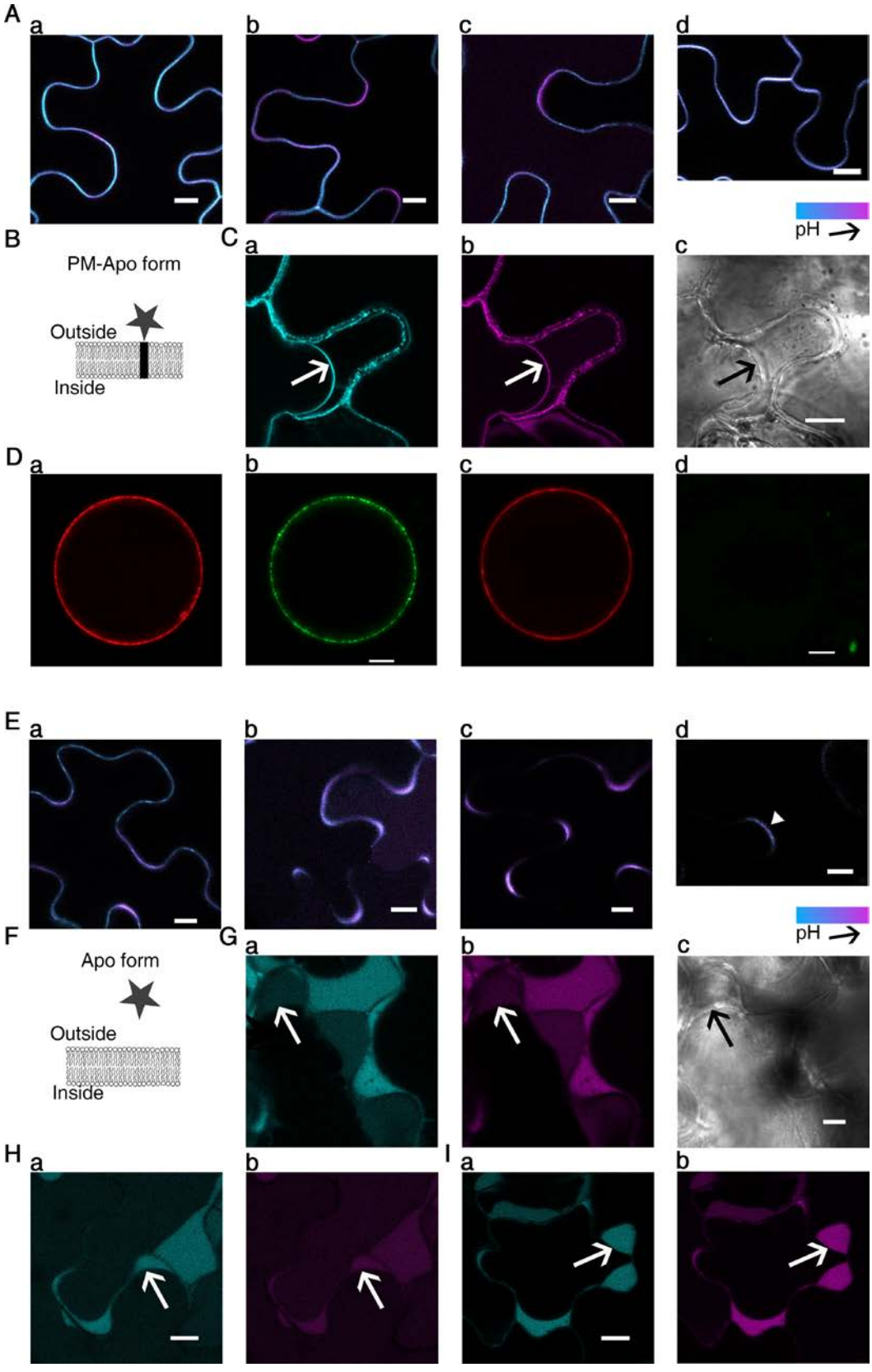

A
a
b
c
d
pH
B
PM-Apo form
Outside
Inside
C
a
b
c
D
a
b
c
d
E
a
b
c
d
pH
F
Apo form
Outside
Inside
G
a
b
c
H
a
b
I
a
b

Figure 2

Figure 2: Characterization of acidins in tobacco epidermal cells
Tobacco epidermal cells were transiently transformed with pH sensors either anchored in the PM (A-D) or released in the apoplast (E-I). Cells were then analyzed after three days of expression with a confocal microscope.
A and E: Expression pattern of either PM---Apo (A) or Apo (F) with acidin2 (a), acidin3 (b), acidin4 (c), or pHluorin (d).
B and F: Schematic representation of the acidin fusion protein PM---Apo (B) or Apo (F).
C, G-I: Cells expressing either PM---Apo-Acidin2 (C), Apo-Acidin2 (G), Apo-Acidin3 (H) or Apo-Acidin4 (I) were submitted to plasmolysis with NaCl 2% for 30 min prior to observation.
D: Living tobacco protoplasts expressing either PM---Apo-Acidin2 (a and b) or the PM protein aquaporin PIP2.1 tagged on its cytoplasmic side with mCherry (c and d) were immunolabelled with rabbit primary anti-DsRed antibodies and secondary anti-rabbit Alexa Fluor 488 F(ab)'2 antibodies. In red (a and c): fluorescence emitted from either mRFP (a) or mCherry (c). In green (b and d): fluorescence signal resulting from immunolabelling was detected only for the PM---Apo-Acidin2 fusion (b), confirming the exposure of mRFP on the outside of the protoplast.
Cyan: fluorescence signal from TagBFP for acidin2, Gamillus for acidin3, SYFP2 for acidin4, or 476Exc for pHluorin. Magenta: fluorescence signal from mRFP for the acidins, or the 496Exc channel for pHluorin. Arrowhead: labeled apoplast. Arrow: PM. Scale bar: 10 µm.

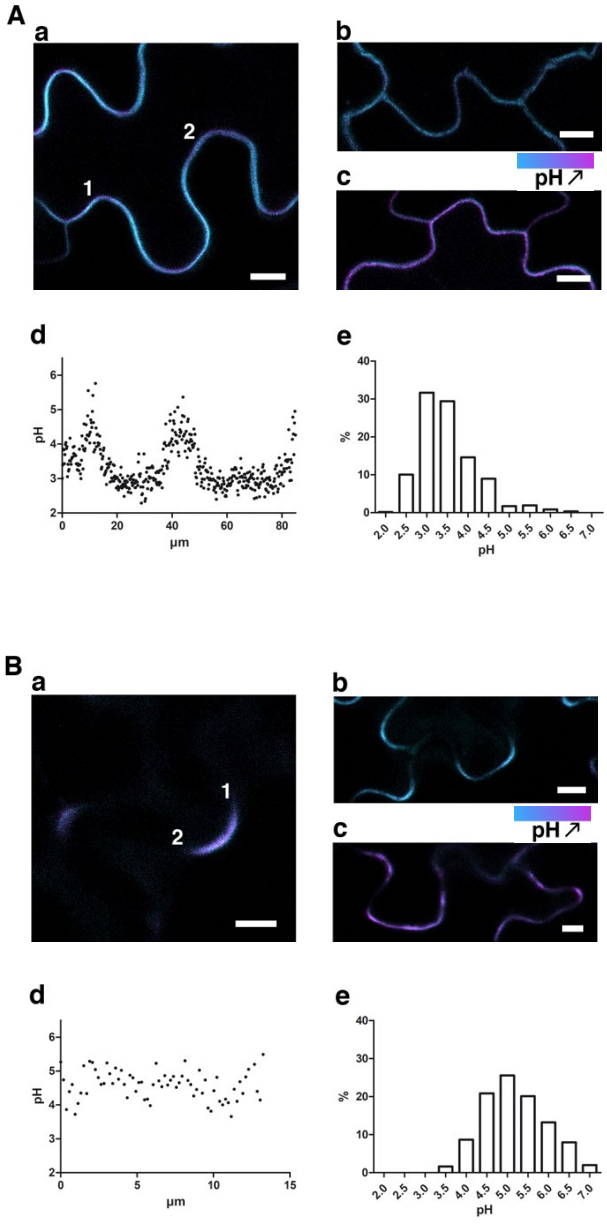


Figure 3: pH distribution in tobacco epidermis expressing acidin2
Tobacco leaves were transiently transformed with PM-Apo-Acidin2 (A) or Apo-Acidin2 (B) and observed after 3 days with a confocal microscope. (a-c): Detail of cells with a typical pattern in water or after 45 min clamping with 20 µM nigericin in pH 2.5 buffer (b) or pH 6 buffer (c). (d): Distribution of pH in the portion of labelled apoplasts from position 1 to position 2 along the cell periphery. (e): Histograms of pH distribution constructed for PM-Apo-Acidin2 (A, n=568) or Apo-Acidin2 (B, n=552). False color: cyan for TagBFP2 signal and magenta for mRFP signal. Scale bar: 10 µm.

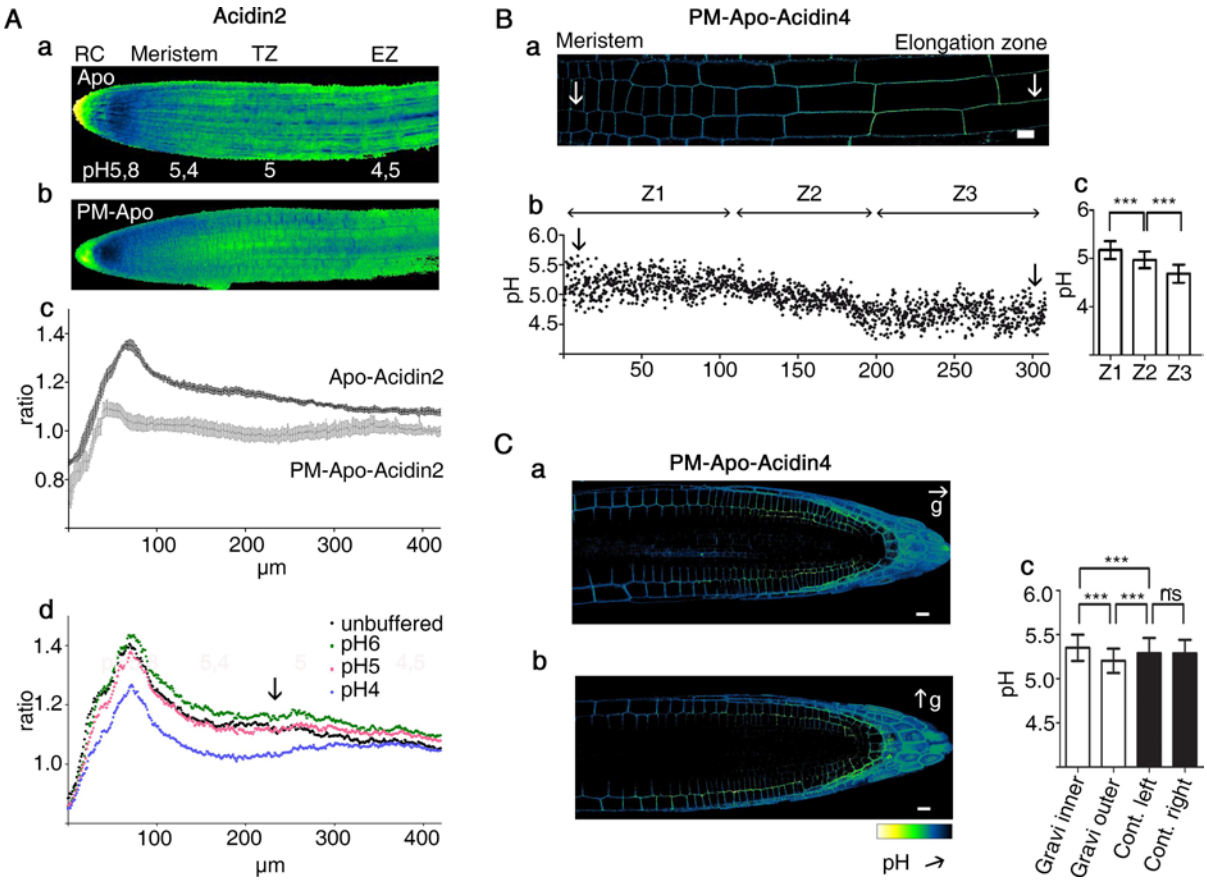


Figure 4: pH variations monitored in living Arabidopsis primary root expressing acidins are associated with cell elongation

Arabidopsis plants were stably transformed with acidins targeted to the apoplast, and fluorescence was observed in the primary roots of 5- to 6-day-old seedlings using ratiometric imaging for acidin2 (A) or a confocal microscope for acidin4 (B and C).

A: Analysis of pH in the first 400 µm (apical part) of primary root tips expressing either Apo-Acidin2 (a, c and d) or PM-Apo-Acidin2 (b and c). (a and b): Ratiometric images in false color with estimated pH (a) from *in vivo* calibration. (c): Typical ratiometric profiles, with high values corresponding to high pH (n = 7 for Apo-Acidin2 and n = 3 for PM-Apo-Acidin2). (d): The absolute ratio of a typical Apo-Acidin2 root tip in unbuffered MS/2 (black) was superposed with profiles of the same root after equilibration with MS/2 medium buffered successively at pH 6 (green), pH 5 (pink) and pH 4 (blue). Arrow: the region in which the MS/2 profile crosses the buffered profile at pH 5.

B: Ratiometric image from a 300-µm portion of the epidermis in the transition zone of a primary root tip expressing PM-Apo-Acidin4 (a) and the corresponding pH profile (b) from the intercellular portion delimited by arrows in (a). (c): Measures of pH in the three zones identified in b (pH_{Z1} = 5.17, n = 2,971; pH_{Z2} = 4.97, n = 2,102; pH_{Z3} = 4.68, n = 2,675).

C: Ratiometric images of root tips from 5- to 6-day-old seedlings expressing PM-Apo-Acidin4 maintained in normal conditions (a) or submitted to a 90° rotation for 25 to 30 min (b). (c): pH measured in the epidermal cell layer at the outer and inner sides of the root after gravistimulation or at the left and right sides for the control root (n = 1,022 to 1,328).

RC: root cap; TZ: transition zone: EZ: elongation zone. Scale bar: 10 µm. The increase in pH is indicated by the color gradient.

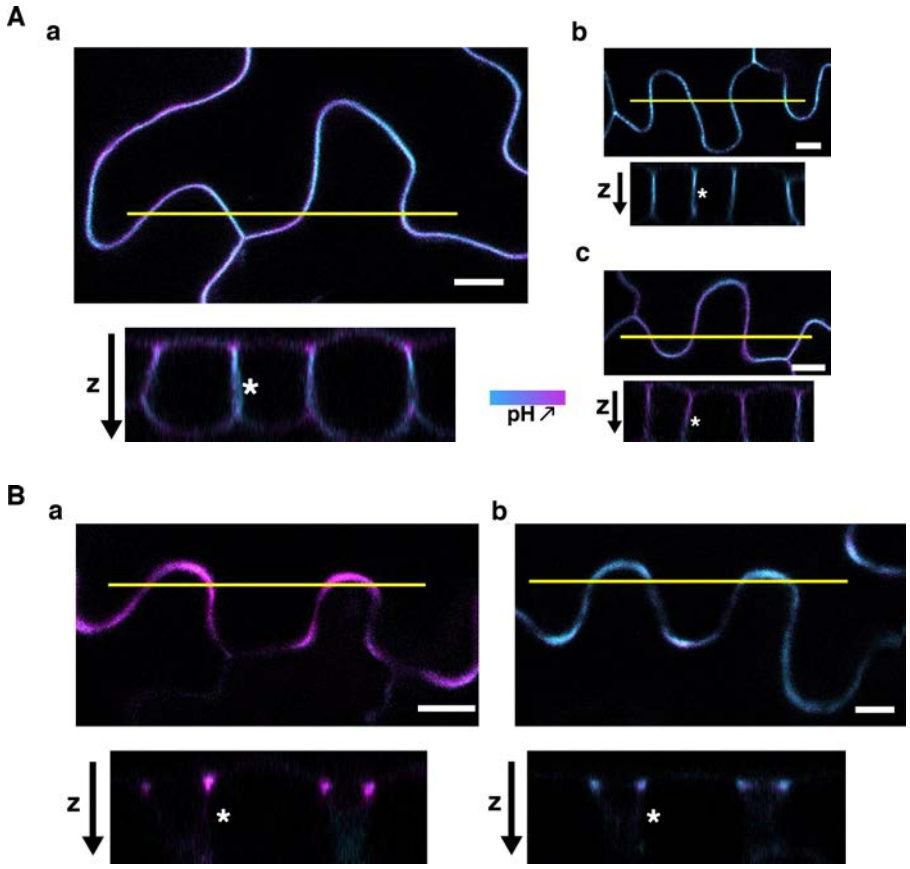


Figure 5: Acidins reveal the existence of apoplastic subdomains with different pH values in tobacco epidermal cells

Tobacco leaves transiently transformed with the sensor PM-Apo-Acidin2 (A) or Apo-Acidin2 (B) were observed under a confocal microscope: in untreated conditions (a); after incubation for 30 to 45 min with 20 µM nigericin, 150mM KCl with 50mM acetate-BTP pH 4.5 (b); or with MES-BTP pH 6.5 (c). Series of confocal images were taken through the thickness of the epidermis and a z projection was performed in the portion of the image indicated by a yellow line.

False color: cyan for TagBFP2 signal and magenta for mRFP signal. Stars indicate the middle of the epidermal layer. Scale bar: 10 µm.

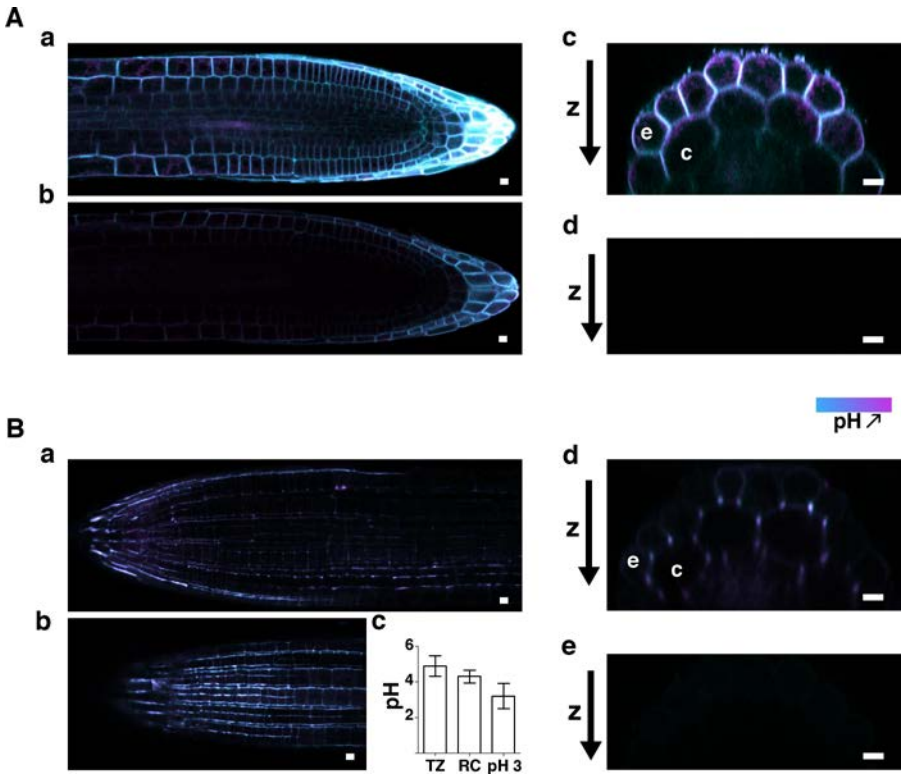


Figure 6: Freely diffusing acidin is concentrated in internal pockets between cell layers
Primary root tips from 5- to 6-day-old Arabidopsis seedlings expressing PM---Apo-Acidin4 (Aa-Ac) or Apo-Acidin2 (Ba, Bb and Bd) were observed with a confocal microscope.
(Aa and Ab) Confocal images at a focal plane in the median section with high (a) or low laser power (b). (Ac) Z projection in the transition zone of a PM---Apo-Acidin4 root or an untransformed root at the same settings (Ad). (Ba and Bb) Confocal images at two different focal planes of the same root; see also Supplemental Movie 3 for the entire z---series. (Bc) pH measured with Apo-Acidin2: in the transition zone (TZ), pH 4.89 (n=100); in the root cap (RC), pH 4.3 (n=123); or after clamping at pH 3 (n=31). (Bd) Z projection in the transition zone of Apo-Acidin2 root or untransformed root at the same settings (Be).
e: epidermis; c: cortex. Scale bar: 10 µm

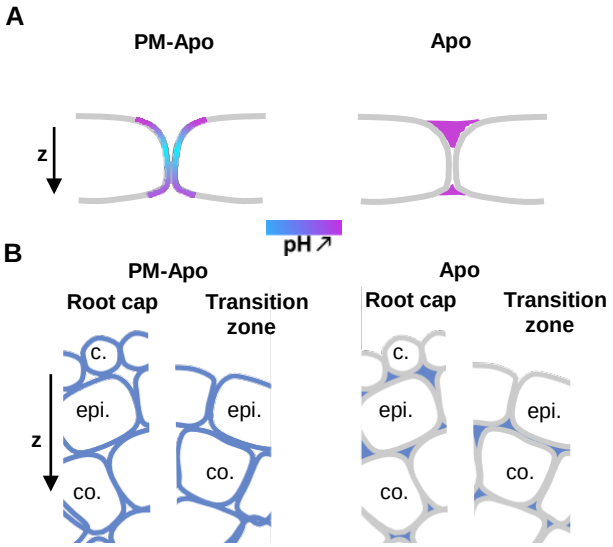


Figure 7: Model for apoplastic subdomains
Schematic z projection of fluorescence labelling in pavement cell epidermis (A) or primary root (B) for PM---anchored (PM---Apo) and freely diffusing (Apo) forms of apoplastic fusions. In pavement cells (A), PM---Apo labels the entire thickness of the epidermal PM while Apo is restricted to the periclinal part of the apoplast, which appears more alkaline than the anticlinal part. In Arabidopsis primary root tips (B), PM---Apo equally labels all cell layers, while Apo is accumulated in pockets between cells and can be detected at the surface of the epidermis only when the root cap cell layer is present.
c.: cap cell layer; epi.; epidermis; co.: cortex.

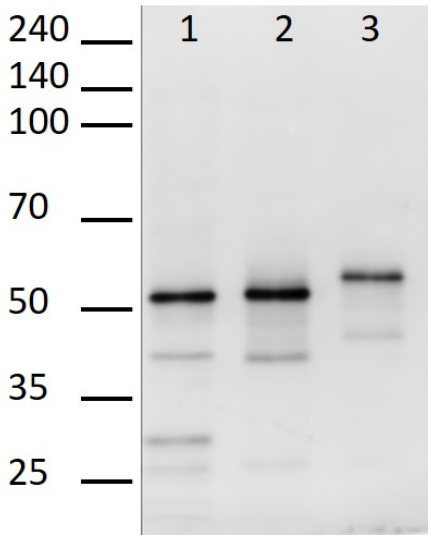


Figure S1: Western blot analysis of the acidins
After production in *E. coli* and purification, acidin proteins were separated by 10% SDS PAGE electrophoresis, and transferred onto nitrocellulose. The resulting membrane wasimmunolabelled with anti-RFP antibodies. The presence of strong bands of the expectedsize (52-54 kDa) for acidin2 (lane1), acidin3 (lane 2), and acidin4 (lane 3) suggests that the sensors produced were uncleaved.

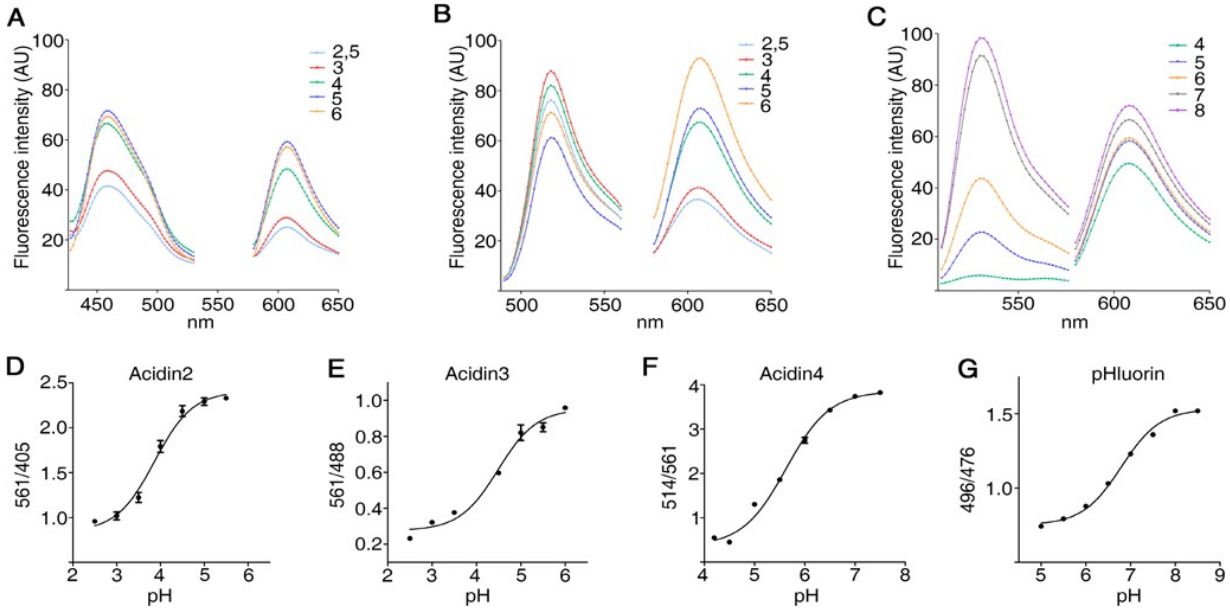


Figure S2: Dynamics of acidin fluorescence as a function of pH
Acidins produced in *E. coli* and then purified were diluted in buffers of different pH and wereanalyzed by spectrofluorometry.
A-C: Emission profiles of Acidin2 (A), Acidin3 (B), and Acidin4 (C) at various pH levels.
D-G: Calibration curves of the three acidins, represented as fluorescence ratios mRFP/TagBFP2(D), mRFP/Gamillus (E), SYFP2/mRFP (F) and 496nm/476 nm (G), and as a function of pH; n = 5 for Acidin2 and Acidin3, n = 10 for Acidin4, and n = 1 for pHluorin.

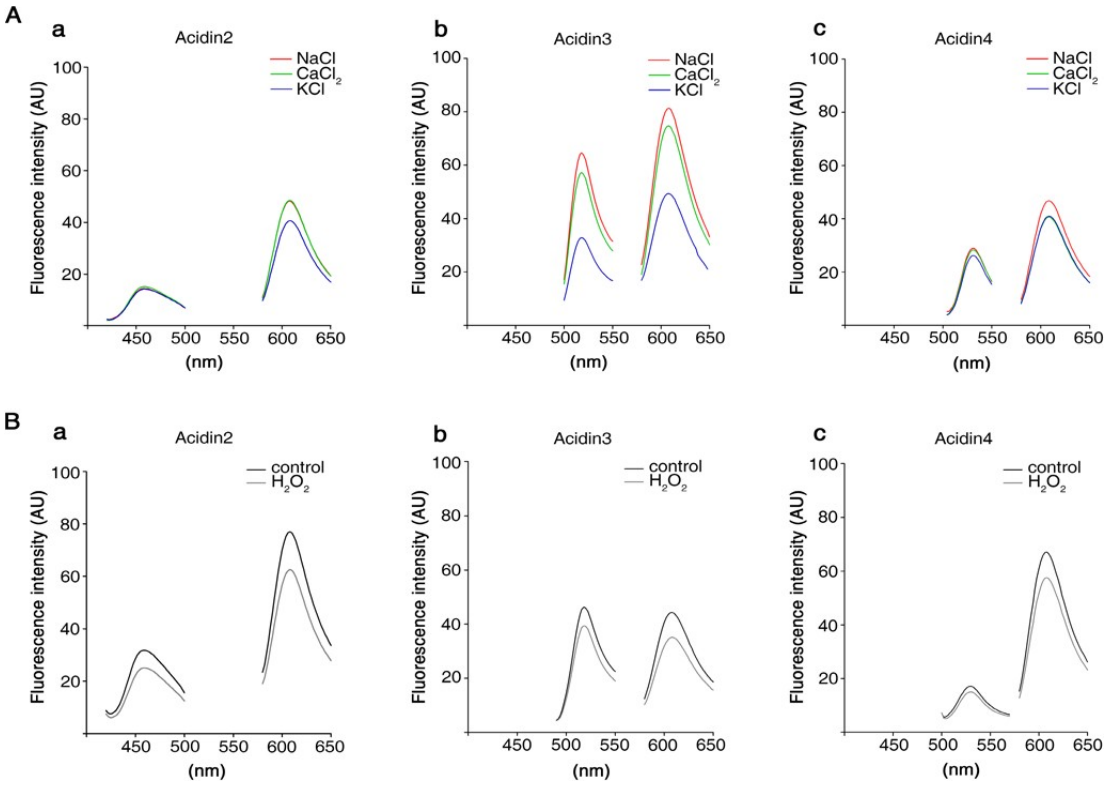


Figure S3: **Impact of ionic and redox environments on acidin fluorescence properties**

A: Emission spectra of Acidin2 (a), Acidin3 (b) and Acidin4 (c) in 100 mM MES-BTP buffer pH6 containing either 100 mM KCl, 100 mM NaCl, or 100 mM $CaCl_2$.

B: Emission spectra of Acidin2 (a), Acidin3 (b) and Acidin4 (c) in 100 mM acetic acid-BTP, 10mM KCl, 2 mM $CaCl_2$ buffer at pH 5 supplemented with either 1 mM DTT (control) or 2 mMH_2O_2.

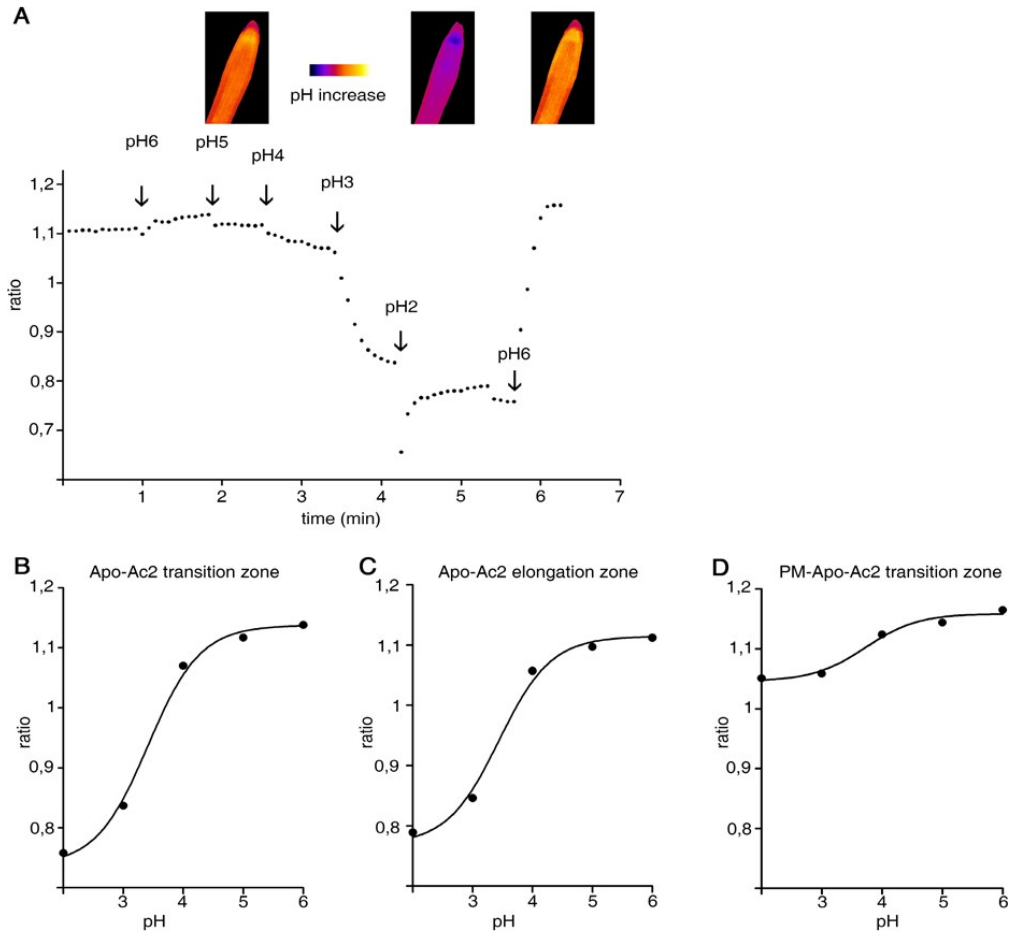


Figure S4: **Real-time response to pH in Arabidopsis primary root tip**
Five-day-old Arabidopsis seedlings expressing Apo-Acidin2 (A-C) or PM-Apo-Acidin2 (D) wereobserved by ratiometric microscopy.
A: mRFP/TagBFP2 fluorescence ratio in the transition zone over time, after perfusion with unbuffered MS/2, and successively with MS/2 buffered at various pH levels (100 mM glycine-HCl for pH 2 and pH 3 or 100 mM MES-KOH 0.1M for pH 4 to pH 6). See also Supplemental Movie 1.
B: *In vivo* calibration curves obtained from the transition zone (B) and the elongation zone (C)of Apo-Acidin2, or from the transition zone of the PM-Apo-Acidin2 (D) root tip.

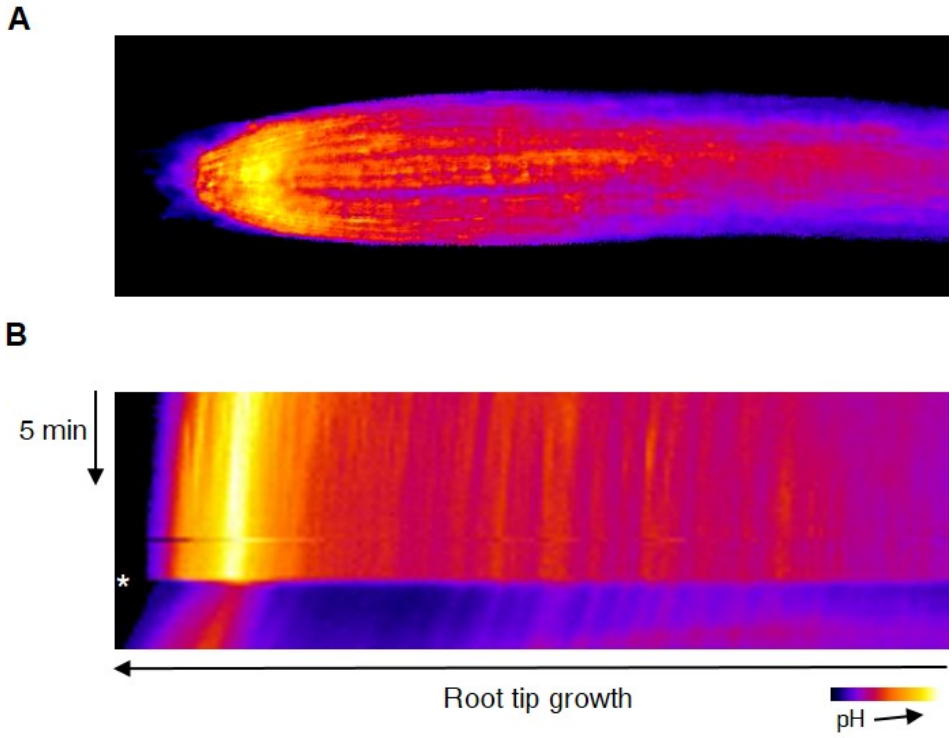


Figure S5: Acidic pH triggers a fast increase in root growth

5- to 6-day-old Arabidopsis seedlings expressing Apo-Acidin2were observed by ratiometric microscopy.

A: Ratiometric image of the root tip at t0 (see corresponding Supplemental Movie 2) in unbuffered MS/2.

B: Kymograph of the root tip in A before and after (star) application of MS/2 100 mM glycine-HCl pH 3 buffer.

The increase in pH is indicated by the color gradient.

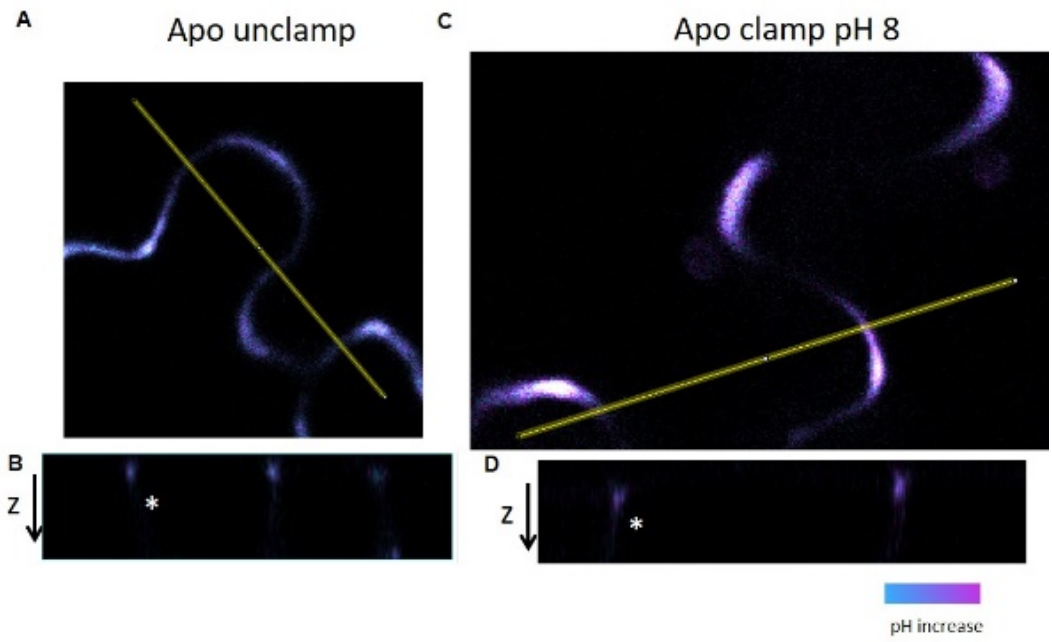


Figure S6: **pH clamping on tobacco cells expressing freely diffusing pHluorin (Apo)**
Clamping results indicate that the signal in the anticlinal region is not detected, even at alkaline pH. Tobacco epidermal cells transiently expressing the sensor Apo-pHluorin were untreated (A and B) or incubated with 40 µM nigericin, 150 mM KCl and 50 mM HEPES pH 8 to clamp the pH (C and D). All observations were performed under a confocal microscope.
A and C: Images from a z-series of a portion of cells expressing Apo-pHluorin that was projected in z (B and D).
False color: cyan for Exc476 signal and magenta for Exc496 signal. The increase in pH is indicated by the color gradient. Star: position of the middle of the epidermal layer.

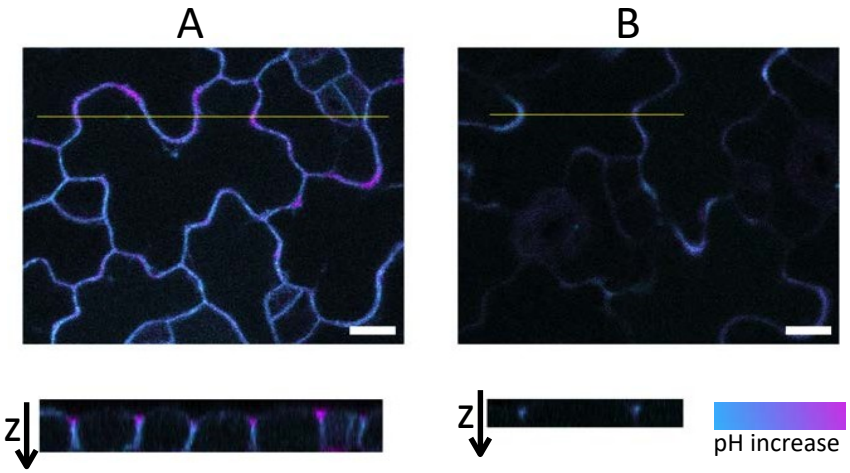
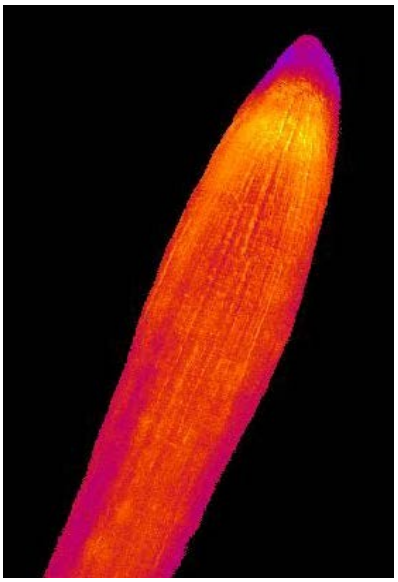
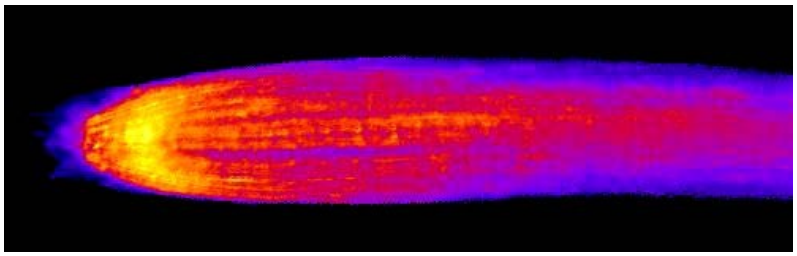


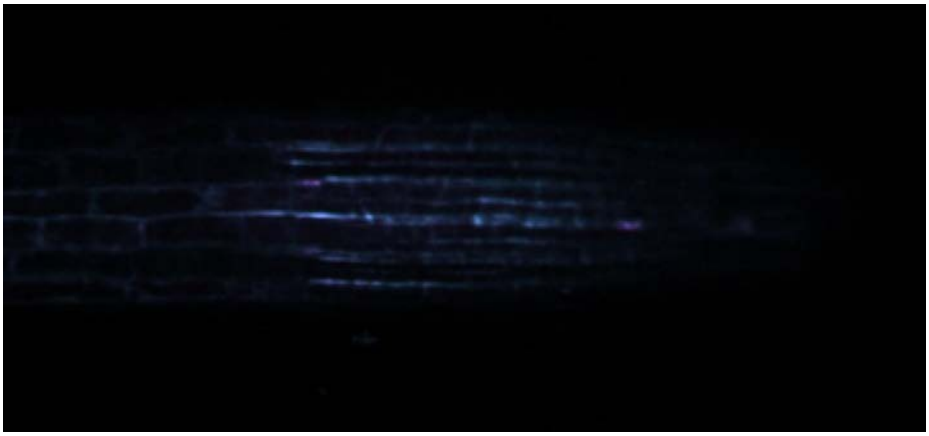
Figure S7: Fluorescence pattern in cotyledon pavement cells
Arabidopsis seedlings expressing either PM-Apo-Acidin2 (A) or Apo-Acidin2 (B) in the cotyledon at 2 to 3 days after germination were observed by confocal microscopy. A series of confocal images were taken through the thickness of the epidermis and a z projection was performed in a selected region marked by the yellow line.
Cyan: TagBFP2 signal. Magenta: mRFP signal. The increase in pH is indicated by the colorgradient. Scale bar: 10 µm



Supplemental Movie 1: Effect of sequential pH changes (no buffer, pH 6, pH 5, pH 4, pH 3, pH 2,pH 6) on 5- to 6-day-old seedlings expressing Apo-Ac2. Total movie length: 6 min. The increase in pH is indicated by the color gradient (purple to yellow).



Supplemental Movie 2: Effect on acidic pH (pH 3) on 5- to 6-day-old seedlings expressing Apo- Ac2. Total movie length: 15 min. The increase in pH is indicated by the color gradient (purple toyellow)



Supplemental Movie 3: Z-series of an Arabidopsis root tip expressing Apo-Ac2. Cyan:TagBFP2 signal. Magenta: mRFP signal.

Discussion et perspectives :

1. Mesures de pH dans un environnement acide

Le développement et la caractérisation des Acidines, senseurs de pH génétiquement encodés adaptés au pH acide, permet d'élargir la gamme de couverture de pH vers des valeurs plus acides. Ces nouveaux outils permettent notamment de réaliser des mesures de pH inférieures à 4 et ainsi, la gamme couverte par les Acidines en complément de la pHluorine va de pH3 à pH8 (Figure II.2). Par conséquent, les Acidines offrent la perspective d'explorer le pH des environnements les plus acides de la cellule comme la vacuole et l'apoplasme.

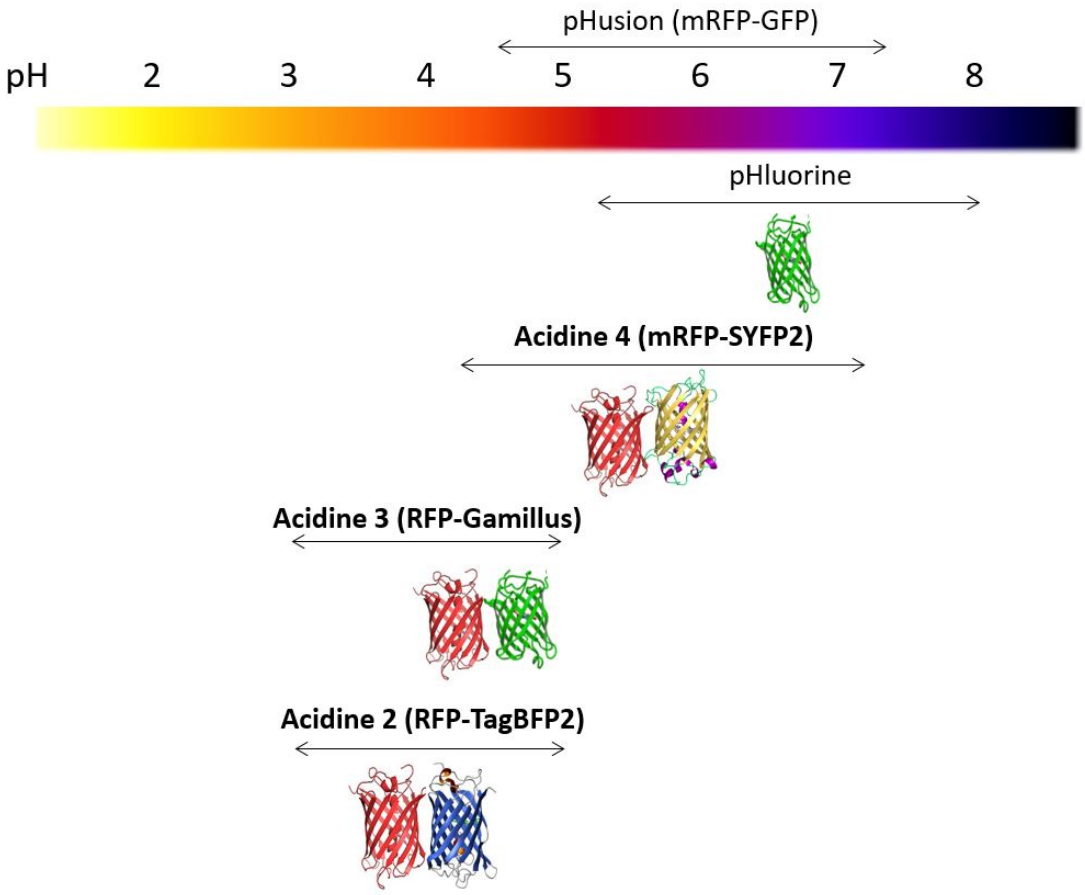


Figure II.2 : Gamme de pH couverte par les Acidines. La gamme de pH couverte est étendue et permet de réaliser des mesures de pH allant de 3 à 8 en incluant la pHluorine.

Afin d'obtenir des valeurs de pH à partir des ratios de fluorescence des deux protéines fluorescentes composant les Acidines nous avons utilisé différents types de calibration : *in vivo*, *in situ* et *in vitro*. Les calibrations *in vitro* et *in situ* sont réalisées à partir d'une dilution d'Acidine produite en bactéries, puis purifiée et diluée dans des tampons de différents pH. La préparation d'un stock unique distribué en aliquots stockés à -20°C assure une grande

homogénéité de la source au cours du temps. Ce type de calibration permet de contrôler strictement la composition ionique et les paramètres physicochimiques de l'environnement dans lequel se trouve l'Acidine. La calibration *in situ* qui consiste à déposer une goutte de senseur dilué sur une lamelle de microscope et à collecter des images confocales de cette gouttelette est rapide et peut être réalisée à chaque séance de microscopie aux différents réglages utilisés. Toutefois, cette calibration ne permet pas de tenir compte des paramètres physicochimiques de la cellule pouvant impacter les propriétés de fluorescence des protéines en général. La calibration *in vivo* permet de corriger ce défaut car elle consiste à imposer un pH au senseur dans son contexte cellulaire. La présence de nigéricine associée à une forte concentration en potassium est nécessaire pour imposer le pH notamment dans le contexte du senseur ancré dans la membrane plasmique (Martinière et al 2018). Ce type de calibration nécessite du temps pour équilibrer le pH. Aussi, la question de l'état physiologique des cellules dont les flux ioniques sont fortement perturbés par la nigéricine se pose. Qu'est-ce que reflète le pH mesuré dans des conditions où les flux ioniques sont fortement impactés par la drogue ?

Dans le cadre de ce travail, les différents types de calibration ont été utilisés pour obtenir des valeurs de pH avec les Acidines. Cependant, les calibrations *in vivo* ont été réalisées sans nigéricine en appliquant seulement un tampon avec une forte force tampon (0,1M). La comparaison des courbes de calibration *in vivo* dans ces conditions et *in situ* a montré un pKa très proche pour ces deux types de calibration. Les calibrations *in vivo* ont permis de mettre en avant la réponse instantanée et réversible des Acidines à un changement de pH. Des gammes de calibration réalisées dans les différentes zones de racines d'Arabidopsis exprimant l'Apo-Acidine2, zone de division (DZ), de transition (TZ) et d'élongation (EZ), présentent des amplitudes variables bien que leur pKa soit très proche (3,42 dans la DZ ; 3,41 dans la TZ et 3,44 dans l'EZ) (Figure II.3). De plus, la DZ est la zone qui présente la plus importante amplitude et au contraire, la EZ est la zone avec la plus faible amplitude. Les différentes zones de la racine possèdent des caractéristiques physiologiques propres qui pourraient permettre une réponse différente aux changements brutaux de pH. Notamment, les flux de protons sont différents entre les zones de la racine avec un efflux de protons dans l'EZ et au contraire une absorption au niveau de la DZ et de la TZ (Staal et al., 2001). Aussi, pour obtenir des informations de pH de façon rigoureuse, il faut idéalement se référer à la courbe de calibration réalisée dans la zone étudiée. Enfin, il serait intéressant de voir si on retrouve le même phénomène en utilisant de la nigéricine pour réaliser les calibrations *in vivo*.

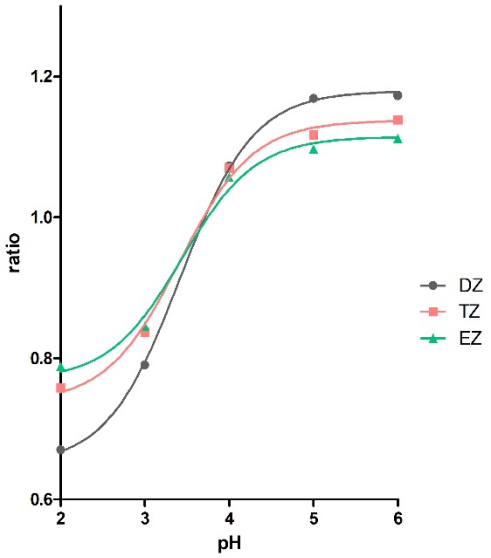


Figure II.3 : Gammes de calibration *in vivo* dans trois zones de la racine exprimant l'Apo-Acidine2 : zone de division (DZ), zone de transition (TZ) et zone d'élongation (EZ). Bien qu'elles présentent un pKa très proche, les gammes ont une amplitude différente selon la zone étudiée. Les gammes de calibration sont réalisées au microscope ratiométrique.

La calibration des Acidines montrent une relation quasi-linéaire entre ratio de fluorescence et pH entre pH3 et pH5 pour les Acidines 2 et 3 et pH4,5 et pH7 pour l'Acidine 4. L'amplitude des réponses au pH est donc optimale dans ces intervalles de valeurs et permet d'obtenir des informations de pH précises et fiables. De part et d'autre de cette phase exponentielle, les mesures réalisées sont moins précises voire impossible en deca ou au-delà des plateaux de pH. Autour de pH5, il y a un faible chevauchement des Acidines, ce qui peut permettre de comparer les valeurs de pH obtenues par deux senseurs. Par contre, c'est un facteur limitant pour étudier des variations de pH de grande amplitude, à la fois en augmentation et en diminution, si le pH de départ est aux alentours de 5. Par exemple, dans l'apoplasme des cellules de la racine d'Arabidopsis, les valeurs de pH les plus acides qui ont été mesurées avec les Acidines sont autour de pH4,5 et coïncident avec la zone d'élongation. Si l'on souhaite étudier les dynamiques de pH de cette zone, le choix de l'Acidine à utiliser doit se faire en fonction de la question posée et des variations de pH attendues. En effet, l'Acidine 2 permettra majoritairement d'enregistrer des phénomènes d'acidification alors qu'au contraire l'Acidine 4, qui est insensible au pH en dessous de pH4,5, sera plus utile pour étudier des phénomènes biologiques conduisant à une alcalinisation. Un senseur de pH avec un pKa aux alentours de pH5 serait idéal pour l'étude des variations de pH dans la zone de transition de l'apoplasme de la racine.

De nombreux mécanismes sont impliqués dans le contrôle du pH apoplasmique, en particulier les H^+-ATPases présentes à la membrane plasmique sont décrites comme jouant un rôle essentiel (Young et al., 1998 ; Haruta et al., 2016 ; Inoue et al., 2016). Il serait intéressant de moduler leur activité par des traitements chimiques comme la fusicoccine qui est un activateur ou le vanadate qui est inhibiteur et d'observer l'effet sur le pH apoplasmique. De plus, il a été démontré sur racine de maïs que la régulation de l'activité de transporteurs de cations impacte fortement le pH apoplasmique (Felle, 1998). Moduler l'activité des canaux potassiques par exemple avec des inhibiteurs comme le $LaCl^{3+}$ ou le $BaCl_2$ permettrait d'évaluer leur rôle dans la régulation du pH apoplasmique. Enfin, la capacité d'échange de cations de la paroi est également impliquée dans la régulation du pH apoplasmique. Les charges négatives portées par les acides galacturoniques des pectines interagissent avec les cations et les piègent de façon réversible. La présence de ces charges négatives est modulée par l'activité des PME. Impacter la capacité d'échange de cations en utilisant du Ca^{2+} pour saturer les charges négatives portées par les pectines pourrait apporter des informations sur le rôle de ce mécanisme dans le contrôle du pH apoplasmique.

2. Hétérogénéité de pH dans l'espace apoplasmique

A) Dans les cellules d'épiderme de tabac

L'expression transitoire de l'Acidine 2 en épiderme de feuille de tabac a révélé une forte hétérogénéité du pH apoplasmique à différents niveaux. En effet, comme en racine d'Arabidopsis, la forme PM-Apo donnent des valeurs de pH plus acides à proximité de la membrane plasmique que celles mesurées avec la forme Apo sécrétée dans l'apoplasme. Bien que la différence entre PM-Apo et Apo soit conservée, l'écart de valeurs est plus marqué en épiderme de tabac avec environ 2 unités de pH de différence entre les deux localisations. Une telle différence suggère l'existence de sous domaines de pH au sein de l'apoplasme. Il est logique que le maintien du pH apoplasmique proche de la membrane plasmique à des valeurs déterminées soit strictement contrôlé puisque qu'il est essentiel (1) à un fonctionnement optimal des transporteurs dont l'activité est en partie régulée par le pH et (2) aux interactions récepteurs/ligands impliquées dans des voies de signalisation également impactées par le pH. Enfin, se pose la question des mécanismes et des acteurs qui sont à l'origine de la régulation du pH dans les différents sous domaines de l'apoplasme.

On retrouve également une forte hétérogénéité du signal fluorescent à l'échelle d'une seule cellule et notamment avec la forme PM-Apo qui donnent des valeurs de pH allant de 2,5

à 4,5 au niveau des lobes des cellules. Ces données suggèrent l'existence de sous domaines de pH dans la zone de l'apoplasme au contact de la membrane plasmique appelée « l'unstirred layer ». Lorsque l'on réalise une projection orthogonale des cellules et que l'on regarde dans l'épaisseur des cellules on se rend compte que la différence est particulièrement importante entre le pH associé à la paroi périclinale et celui associé à la paroi anticlinale où il est particulièrement acide. Actuellement, il y a peu de connaissances sur les mécanismes qui conduisent à l'initiation et l'expansion des lobes conférant à ces cellules la forme d'une pièce de puzzle (Zuch et al., 2021). Ces différences de pH pourraient être étudiées en parallèle de la croissance anisotropique des cellules épidermales de feuilles où une forte hétérogénité de vitesse de croissance est observée (Elsner et al., 2018). De plus, dans les cellules animales, l'hétérogénéité du pH proche de la membrane plasmique a été associée à des changements de protonation des acides présents sur les phospholipides composant la membrane plasmique. Ceci affecte la courbure de la membrane plasmique et également la formation de nanodomaines (Angelova et al., 2018). On peut penser qu'un phénomène similaire a lieu en cellules de plantes.

B) Dans la racine primaire d'Arabidopsis

Dans la racine primaire d'Arabidopsis, l'expression stable des Acidines a permis l'étude des variations de pH apoplasmique en lien avec l'élongation des cellules. L'Apo-Acidine 2 révèle un profil de pH apoplasmique selon l'axe longitudinal qui ressemble fortement à celui établit par Staal et al., grâce à des microélectrodes à pH (Staal et al., 2011). Dans la zone méristématique, le pH mesuré avec l'Apo-Ac2 atteint un pic maximal à 5,8, diminue graduellement pour atteindre 5,4 à la fin de la zone méristématique puis chute à 5 dans la zone de transition et enfin atteint 4,5 dans la zone d'élongation. Avec la PM-Apo-Ac4, une acidification graduelle allant de 5,17 à la fin de la zone de division à 4,68 au niveau des cellules en élongation est détectée. Ces données permettent de conclure que les valeurs mesurées avec les Acidines 2 et 4 sont cohérentes entre elles et avec ce qui est décrit dans la littérature. En effet, des valeurs de pH comprises entre 5,6 et 5,3 ont été mesurées dans la zone de transition à l'aide de l'HPTS (sonde fluorescente) ou avec des microélectrodes à H^+ (Barbez et al., 2017 ; Staal et al., 2011). Dans la zone d'élongation, les pH mesurés avec de l'oregon green fusionné à un domaine de liaison à la cellulose ou avec le biosenseur SYP122-pHusion fluctuent entre 4,8 et 5,3 (Fasano et al., 2001 ; Kesten et al., 2019). L'originalité de nos données réside dans le fait qu'il y a une différence de pH selon la localisation dans l'apoplasme. Etant donné que dans la pointe racinaire, les pH mesurés avec la forme PM-Apo des Acidines semble plus acide que celui mesuré avec la forme Apo.

3. Couverture de l’espace apoplasmique par les PM-Apo et Apo Acidines

Une des limites de ce travail est que les formes Apo et PM-Apo des Acidines permettent seulement de couvrir une faible partie de l’apoplasme : l’unstirred layer et les espaces entre les cellules où la forme Apo semble s’accumuler. En effet, malgré leur compatibilité avec les pH acides, les Acidines sécrétées ne permettent pas de marquer l’entièreté de l’espace apoplasmique. De plus, lorsque l’on impose un pH optimal pour la fluorescence des Acidines, on ne retrouve pas de signal dans tout l’espace apoplasmique. Ces données permettent de conclure que la diffusion des protéines dans l’espace apoplasmique est limitée. La présence de la paroi et plus particulièrement son maillage pourrait jouer un rôle dans la diffusion des protéines dans l’espace « libre » de diffusion de l’apoplasme. La taille des pores de la paroi est estimée entre 30 et 50Å et pourrait limiter la diffusion des protéines possédant une taille supérieure (Carpita et al., 1979). Par ailleurs, la paroi a déjà été décrite comme jouant un rôle sur la diffusion latérale des protéines membranaires (Martinière et al., 2012). Plus précisément la composition de la paroi et le degré de méthylation des pectines sont décrits comme impactant la diffusion des protéines (Mc Kenna et al., 2019 ; Willats et al., 2001). Afin d’étendre la couverture de l’apoplasme, il serait intéressant d’adresser les senseurs de pH sous une autre forme que sécrétée ou ancrée à la membrane plasmique et notamment par le biais d’interaction avec les polysaccharides qui compose la paroi.

4. Obtention de données de pH à l’échelle d’une seule cellule

Dans le cadre de ce travail, nous avons exprimé les Acidines sous le contrôle de promoteur fort et ubiquitaire, ce qui a pour conséquence qu’une grande majorité de cellules fluoresce. Une des limites de cette stratégie est que le signal fluorescent observé et mesuré correspond en réalité à une moyenne du signal de deux cellules adjacentes. Sur la figure II.4, le signal fluorescent pointé par la flèche blanche englobe la fluorescence du trichoblaste 1 qui est dans la zone de transition et l’atrichoblaste 2 qui est localisée dans la zone de division. Ainsi, le pH mesuré grâce au ratio de fluorescence de cette ligne correspond à la moyenne de pH de deux types cellulaires à deux stades développementaux différents.

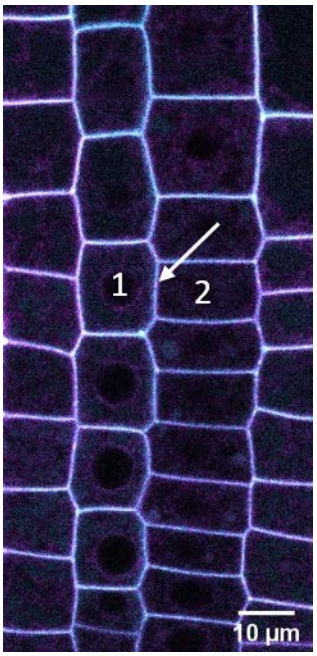


Figure II.4 : Observation au microscope confocal de cellules racinaires d'une plantule d'Arabidopsis de 5j exprimant la PM-Apo Acidine4. La flèche blanche pointe une ligne entre deux rangées cellulaires. La cellule 1 est dans la zone de transition alors que la cellule 2 a une morphologie indiquant qu'elle est dans la zone de division. Cyan = signal SYFP2 et magenta = signal mRFP.

Afin d'obtenir des informations de pH à l'échelle d'une seule cellule, une stratégie intéressante est l'étude du poil racinaire qui est un excellent modèle pour l'étude de la croissance cellulaire. En effet, l'élongation du poil racinaire est asymétrique et s'accomplit grâce à la sécrétion polarisée de matériel au niveau de la pointe. La croissance se déroule selon des oscillations rapides permettant une vitesse de croissance moyenne d'1µm/min. Ces oscillations de croissance s'accompagnent de fluctuations de gradients de Ca^{2+} intracellulaire, d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et aussi de pH extracellulaire mesuré grâce à la fluorésceine dextran (Monshausen et al., 2007, Rounds et al., 2011).

L'utilisation des sondes fluorescentes NERF-dextran et texas rouge-dextran a aussi permis d'étudier les variations de pH apoplasmique au cours de l'élongation du poil racinaire et il a été montré qu'au moment de l'initiation, le pH apoplasmique chute jusqu'à 4,5, se stabilise à cette valeur avant d'augmenter jusqu'à 6 au cours de la croissance du poil (figure III.5) (Bikikova et al., 1998).

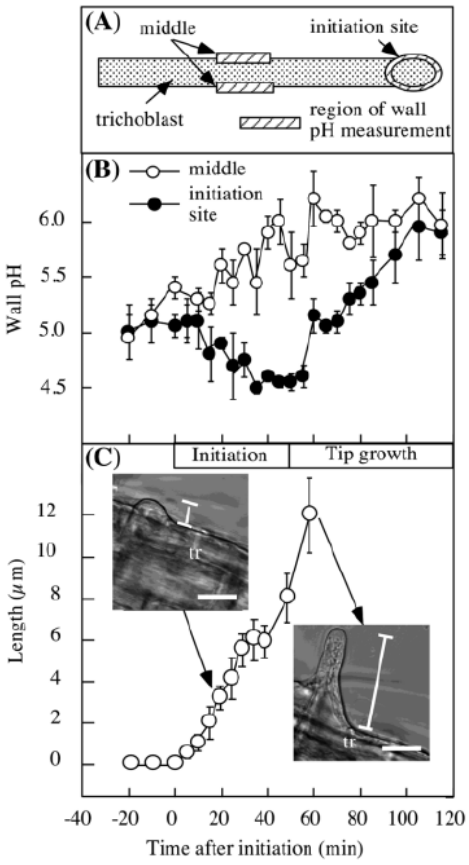


Figure II.5: La croissance du poil racinaire s'accompagne de variations de pH. Au niveau du site d'initiation du poil racinaire, une chute de pH est enregistrée au moment de l'initiation du poil racinaire puis le pH s'alcalinise au cours de la croissance. Le pH des faces longitudinales du poil racinaire « middle » s'alcalinise lors de l'initiation et de l'élongation puis se stabilise au-dessus de 6, un pH similaire à celui de la zone d'initiation. (Bibikova et al., 1998)

Une des approches permettant l'obtention d'informations sur une cellule unique est l'utilisation de promoteur spécifique des trichoblastes. C'est pourquoi, nous avons généré des lignées exprimant l'Acidine 4 sous le contrôle d'un promoteur spécifique des trichoblastes (promoteur d'*EXPANSINE7* (*EXPA7*), AT1G12560). Dans la racine, les bases de données indiquent que ce gène est exprimé dans les tissus vasculaires et au niveau de l'épiderme à partir de la zone de transition jusqu'à la zone de maturation. De plus, i est fortement exprimé au moment de l'émergence des poils racinaires (figure III.6).

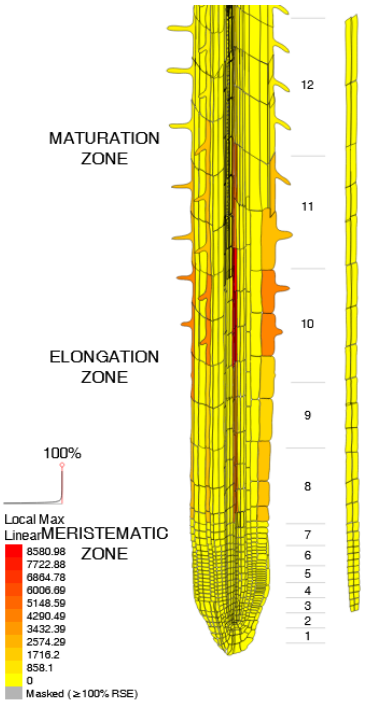


Figure II.6 : Profil d'expression du gène *EXPANSINE 7* dans la racine. (ePlant)

La construction EXPA7 ::PM-Apo-Acidine 4 ::TNOS a été réalisée avec le système Golden Braid. Le patron d'expression de la construction a été étudié dans des racines d'Arabidopsis de 5j. Malheureusement, contrairement aux données disponibles sur ePlant, aucun signal fluorescent n'est visible dans les cellules en élongation avant l'émergence du poil, excluant la zone de transition de toute étude. A partir du moment où le poil racinaire initie sa croissance, un signal fluorescent est visible en contour des trichoblastes. Ce signal est d'une intensité moyenne pour la SYFP2. En revanche, le signal de la mRFP est très faible et détectable uniquement avec des réglages de forte intensité. (Figure III.7 A). Des intensités de signal comparables sont également observées dans les poils en élongation ou ayant atteint leur taille finale (Figure III.7 B et C). La faible intensité de fluorescence de la mRFP dans les poils racinaires rend difficilement exploitable la lignée PM-Apo-Acidine4 sous le contrôle du promoteur EXPA7 et l'obtention d'informations de pH dans ces conditions.

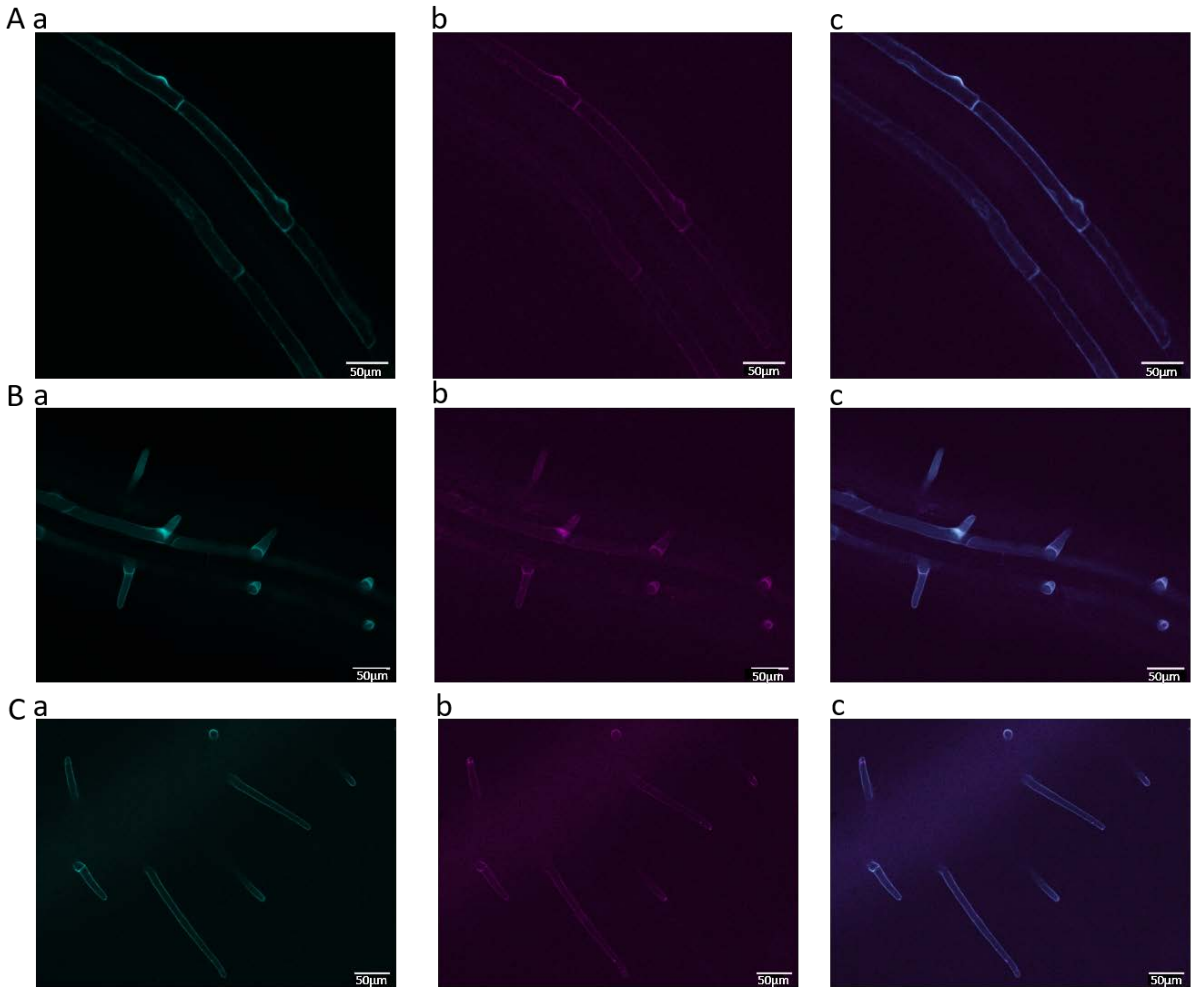


Figure III.7 : Observation au microscope à épifluorescence des poils racinaires à différents stade de croissance d'une racine d'Arabidopsis de 5j exprimant pEXPA7::PM-Apo-Acidine4::TNOS. A) Initiation des poils racinaires. B) Poils racinaires en cours d'élongation. C) Poils racinaires possédant leur taille définitive. a) Signal fluorescent de la SYFP2 en cyan, b) Signal fluorescent de la mRFP en magenta et c) Superposition des deux signaux fluorescents.

La lignée exprimant l'EXPA7 ::PM-Apo-Acidine4 ne donnant pas de signal exploitable, nous nous sommes intéressés aux lignées exprimant l'Acidine 4 sous le contrôle du promoteur UBQ10 et au signal fluorescent présent dans les poils racinaires. Les trichoblastes des lignées PM-Apo-Acidine4 et Apo-Acidine4 de 5j ont été observés au microscope confocal. Ces lignées présentent un signal fluorescent exploitable dans les deux canaux SYFP2 et mRFP au niveau des faces latérales et de l'apex des poils racinaires (Figure II.8 et .9). De façon surprenante, la forme Apo-Acidine4 ne semble pas diffuser dans le milieu comme c'est le cas pour la pointe racinaire. L'analyse du pH dans ces deux sous domaines de l'apoplasme révèle que la pH apoplasmique à proximité de la membrane plasmique (PM-Apo) semble moins acide que le pH

de l'espace libre de diffusion (Apo). En effet, la PM-Apo-Acidine 4 révèle un pH de 5,5 au niveau de l'apex du poil et un pH plus alcalin au niveau des faces longitudinales qui varie entre 5,5 et 6 (Figure II.8). L'Apo Acidine 4 indique un pH de 4,7 au niveau de l'apex du poil qui augmente jusqu'à 5,5 au niveau des faces longitudinales (Figure II.9). Ces données sont préliminaires car sur peu de poils et semblent indiquer qu'il y a un gradient de pH le long des poils racinaires avec une légère acidification au niveau de l'apex dans les deux sous-domaines de l'apoplasme Apo et PM-Apo.

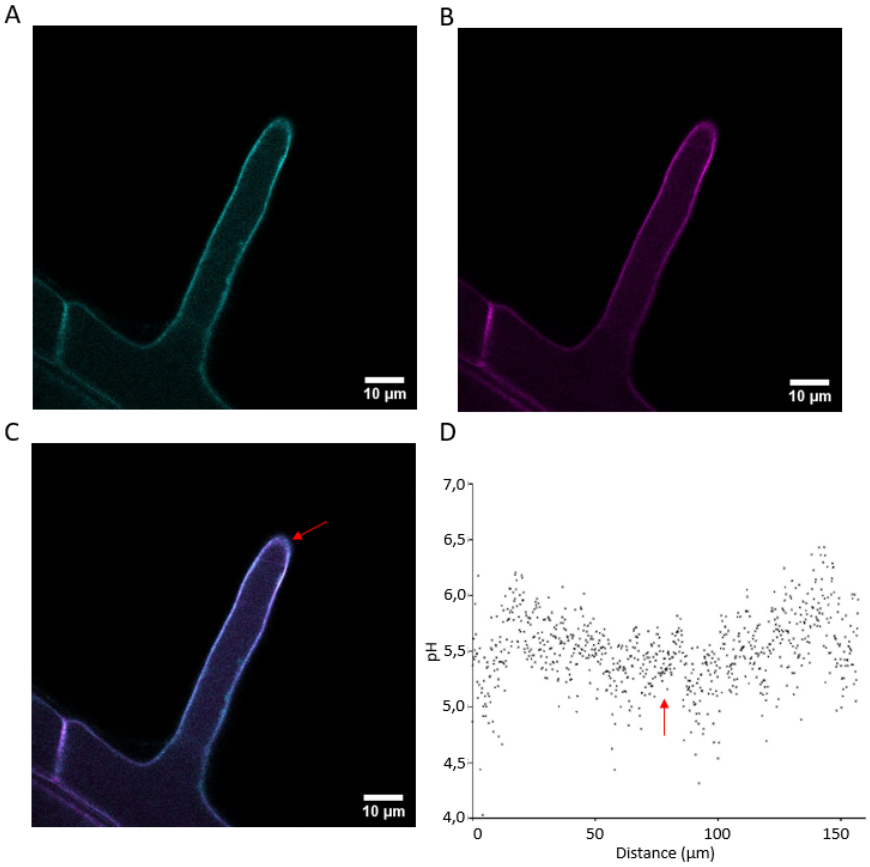


Figure II.8 : Marquage de la PM-Apo-Acidine 4 dans un poil racinaire en élongation d'une racine d'Arabidopsis de 5j après excitation à 488 et 561nm. A) Signal fluorescent de la SYFP2 en cyan. B) Signal fluorescent de la mRFP en magenta. C) Superposition des deux signaux fluorescent. D) Mesure de pH le long du poil racinaire avec calibration *in situ*. La flèche rouge indique une zone correspondant à la pointe du poil racinaire. Echelle = 10µm.

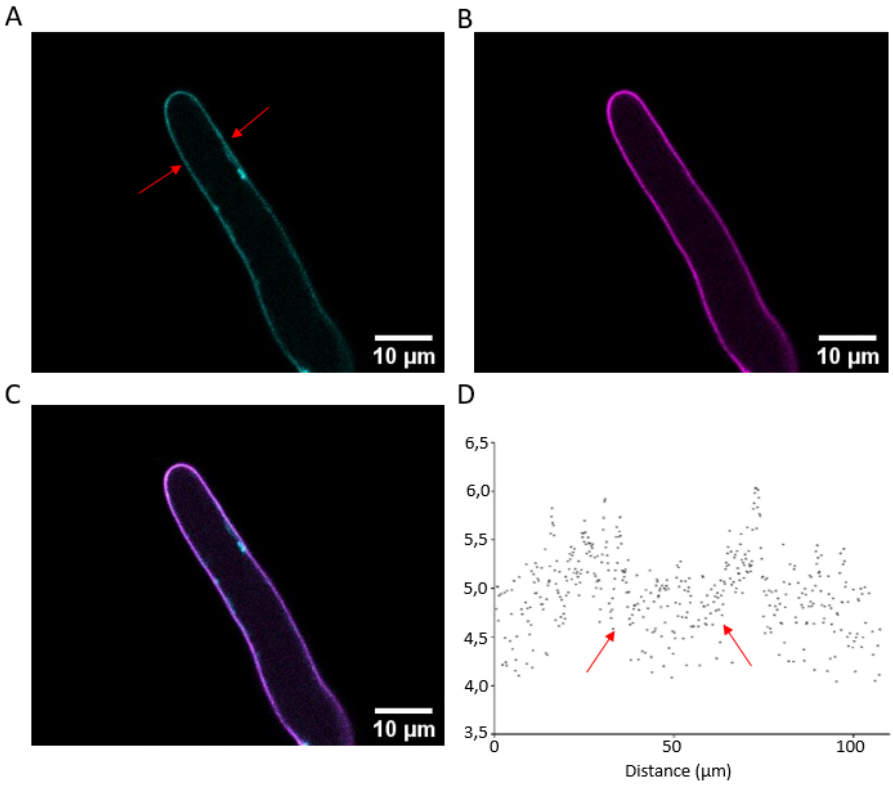


Figure II.9 : Marquage de l'Apo Acidine 4 dans un poil racinaire en élongation d'une racine d'Arabidopsis de 5j après excitation à 488 et 561nm. A) Signal fluorescent de la SYFP2 en cyan. B) Signal fluorescent de la mRFP en magenta. C) Superposition des deux signaux fluorescents. D) Mesure de pH le long du poil racinaire par calibration *in situ*. Les deux flèches rouges indiquent une zone dans laquelle le pH est plus acide et qui correspond à l'extrémité du poil racinaire.

Les poils observés présentaient des vitesses de croissance variables, entre 0,4 et 1µm/min et peu reproductibles. Les conditions de culture et de montage pour observation sont les mêmes que nous utilisons pour observer la racine primaire. Il serait intéressant de tester des conditions de culture et d'observation plus appropriées à la croissance des poils racinaires afin de mettre en relation les données de pH et les données de croissance.

5. Potentiel des Acidines

Les Acidines répondent immédiatement et réversiblement à un changement de pH dans leur environnement et leur potentiel pour l'étude de variations du pH apoplasmique dans un contexte physiologique a été illustré en réponse au gravitropisme. Un autre exemple est présenté dans ce paragraphe pour illustrer le potentiel de ces nouveaux biosenseurs de pH dans le contexte de la croissance de la racine primaire d'Arabidopsis.

La famille des peptides sécrétés RALF (rapid alkalinisation factors) induit une rapide alcalinisation de l'espace extracellulaire des cellules de plantes (Pearce et al., 2001 ; Blackburn et al., 2020). L'interaction des peptides RALF avec leurs récepteurs membranaires de la famille des CrRLK1s (receptor like kinase 1 like) entraine une inhibition des H^+-ATPases qui se traduit entre autre par un ralentissement de la croissance racinaire (Haruta et al., 2014 ; Gonneau et al., 2018)

Dans la littérature, il est décrit qu'à court terme, l'application de peptides RALF8, 33 et 36 déclenche une alcalinisation rapide du pH apoplasmique dans la zone d'élongation de racines d'Arabidopsis associée à un pic de calcium cytosolique (Gjetting et al., 2020). La réponse est variable selon le peptide utilisé et RALF33 entraine une alcalinisation moins importante que les deux autres ce qui est associé à un effet plus faible sur la croissance.

RALF 22 a aussi été décrit comme impactant la croissance de plantules d'Arabidopsis poussant sur un milieu de culture contenant du 2µM de RALF22 qui conduit à une inhibition de la taille de la racine de 50% (Abarca et al., 2021). De la même façon, la taille de l'hypocotyle est réduite d'un facteur 1,75 après 4j d'incubation avec du RALF22 10µM (Morato do Canto et al., 2014). Au niveau cellulaire, l'application de RALF22 entraine un pic de calcium cyosolique au bout de 40s (Morato do Canto et al., 2014). Cependant, l'effet de RALF22 sur le pH apoplasmique n'est pas décrit. Nous l'avons ainsi sélectionné pour traiter des racines primaires d'Arabidopsis de 5j exprimant la PM-Apo-Acidine4 avec du RALF22 de synthèse (fourni par Martine Gonneau, IJPB Versailles) à une concentration de 10µM (Figure II.10).

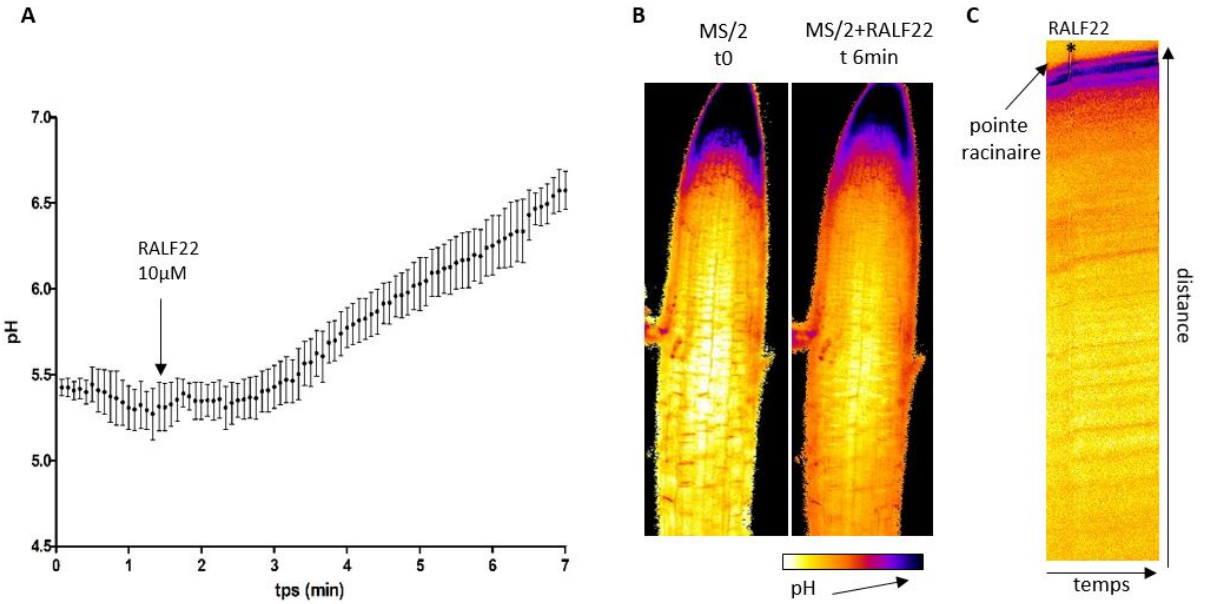


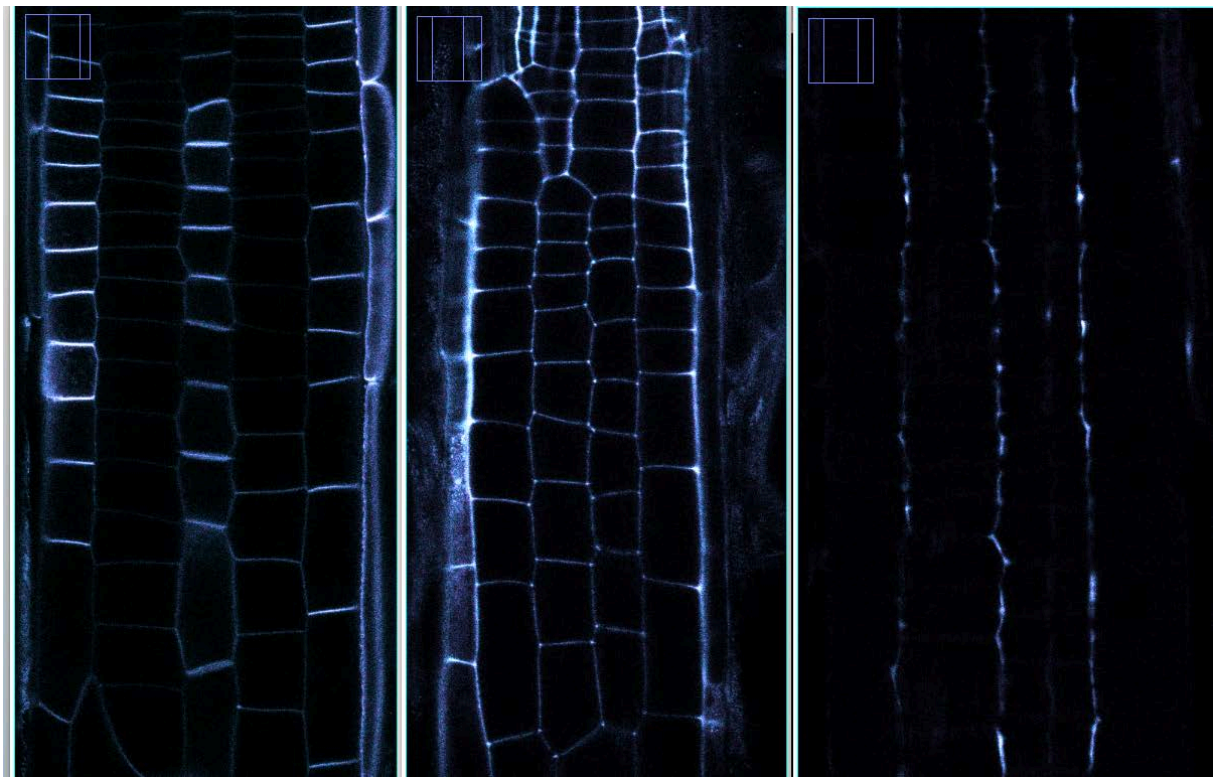
Figure II. 10 : Effet de RALF22 sur le pH de la zone de transition de plantules de 5j exprimant la PM-Apo-Acidine4. A) Evolution du pH de la zone de transition au cours du temps. L'application du RALF22 10µM est indiquée par une flèche. B) Images ratiométriques de la racine avant et après 6min de traitement. Plus la couleur est jaune et plus le pH est acide. C) Image ratiométrique d'un kymographe d'une racine traitée avec RALF22. Le début du traitement est indiqué par une étoile noire.

L'effet de RALF22 sur le pH apoplasmique est progressif et l'augmentation est linéaire deux minutes après le début du traitement. Au bout de 6min, le pH a augmenté de plus d'une unité pH passant de pH5,3 à l'état stationnaire à 6,5 (Figure III.10 A). Cependant, la cinétique de réponse semble différente de celle observée dans la zone d'élongation avec RALF8, 33 et 36 qui est plus rapide (3 à 4 min) et d'amplitude plus faible (0,2-0,5 unité pH) (Gjetting et al., 2020). L'effet sur la croissance est visible sur le kymographe et semble immédiat (Figure III.10 C). L'augmentation de pH apoplasmique est donc associée à une diminution de la vitesse de croissance qui est de 4µm/min en moyenne avant traitement et chute à 0,63µm/min après l'injection de RALF22 10µM.

Cet exemple d'application avec l'Acidine 4 offre de nouvelles perspectives pour l'utilisation des Acidines dans des contextes physiologiques impliquant des variations de pH apoplasmique. Les données dont nous disposons s'inscrivent dans un contexte de croissance et on peut penser que les Acidines se révéleront utiles dans d'autres contextes impliquant des variations de pH apoplasmique comme les interactions plantes/ pathogènes ou la nutrition.

Chapitre 3 : Développement et caractérisation de nouveaux senseurs pour explorer le pH de la paroi

PM-Apo pHluorine PME1mutée-pHluorine Apo-pHluorine



Zone de transition de racines primaires d'Arabidopsis exprimant la pHluorine dans trois localisations de l'apoplasme.

Chapitre 3 : Développement et caractérisation de nouveaux senseurs pour explorer le pH de la paroi

Introduction

Comme décrit dans le chapitre 2, seule une partie restreinte de l'apoplasme est accessible avec les formes des Acidines libres de diffusion, Apo, ou ancrées à la membrane plasmique, PM-Apo. En effet, les formes Apo se répartissent dans une fraction des espaces libres entre les cellules et les formes PM-Apo se limitent à donner le pH dans l'unstirred layer au contact de la membrane plasmique. L'objectif au cœur de ce chapitre est d'obtenir de nouveaux senseurs permettant d'atteindre d'autres domaines de l'apoplasme. La stratégie choisie afin d'élargir cette couverture est d'adresser les senseurs de pH à la paroi en les fusionnant à des protéines pariétales. Une stratégie similaire a déjà été utilisée pour localiser la sonde fluorescente Oregon Green (OG) dans la paroi. En effet, l'OG a été fusionné avec un peptide contenant un domaine de liaison à la cellulose d'une cellulase de la bactérie *Clostridium cellulovarans* (Fasano et al., 2001).

Il existe une large variété de protéines qui interagissent avec les polysaccharides qui composent la paroi. Chez Arabidopsis, au moins 500 protéines associées à la paroi ont été identifiées. Parmi elle, la protéine AT5G11420 appartenant à la famille DUF642 (Domain of Unknown Function) a été localisée dans la paroi par une approche protéomique (Albenne et al., 2014). De plus, la fusion de la protéine AT5G11420 avec des protéines fluorescentes (Albenne et al., 2014 : Stoddart et Rolland, 2019) a confirmé son association avec la paroi. *In vitro*, il a été démontré que la protéine AT5G11420 interagit avec le site catalytique d'AtPME3 (At3g14310) suggérant une localisation associée aux pectines (Zuñiga-Sànchez et Gomboa-de Buen, 2012).

Parmi les protéines associées à la paroi, on retrouve les PME. Ces dernières appartiennent à une famille multigénique qui compte 66 membres chez Arabidopsis. Chez le lin, *Linum usitatissimum* L. cv. Ariane), trois d'entre elles ont été isolées dans l'hypocotyle : LuPME1, LuPME3 et LuPME5 (Al-Qsous et al., 2003). En particulier, la fusion LuPME1-GFP est localisée dans la paroi lorsqu'elle est exprimée transitoirement en épiderme de tabac (thèse d'Emilie Carpentier, 2005). De par sa fonction prédite de dé-méthylation des homogalacturonanes (HGs), on s'attend à ce que cette LuPME1 soit associée aux pectines.

Nous avons donc choisi ces deux protéines pariétales afin d'adresser les senseurs de pH à la paroi. Dans ce chapitre, seront présentées principalement les données de caractérisation pour

des fusions avec la pHluorine car ce sont les plus abouties à ce jour et quelques données préliminaires avec les Acidines.

Résultats :

I. Fusion avec la protéine pariétale LuPME1

1. Origine et description de la protéine LuPME1

Les PMEs de plantes sont classifiées en 8 classes sur la base de la comparaison de séquences matures contenant les 5 domaines caractéristiques 44_GxYxE, 113_QAVAL, 135_QDTL, 157_DFIFG, 223_LGRPW et de leur site de clivage (Markovic et Janecek, 2004). La LuPME1 appartient à la classe Plant1a qui est composée de PMEs possédant un motif de clivage consensus RK/RLLQ/E/D. Certaines de ces PMEs, comme la LuPME1, possèdent un second site de clivage RKLL. La présence de deux sites de clivage est originale car un seul site de clivage semble suffisant pour générer la forme active de la protéine. De plus, ce deuxième site de clivage RKLL n'est pas retrouvé dans la séquence de la LuPME3 et LuPM5, deux autres PME de lin identifiées et caractérisées. Puis, par homologie de séquence, la LuPME1 est classée dans la catégorie des PME de type 1 qui possèdent une région inhibitrice PMEI dans leur pro région (Pinzon-Latorre et Deyholos, 2013) et une structure bien conservée. La séquence codante de *Lupme1* (AF355056) de 1972 pb a été isolée à partir d'hypocotyle de Lin (*Linum usitatissimum* L. cv. Ariane) (Al-Qsous et al., 2003). Mise à part sa localisation dans la paroi confirmée par les travaux de thèse d'Emilie Carpentier, il n'y a pas de données sur la fonction de la LuPME1 chez le Lin. Chez Arabidopsis, son homologue AtPME1 serait impliqué dans la croissance du tube pollinique (Tian et al., 2006). Chez la banane Musa spp. AAA, l'expression de MaPME1 augmente après infection par *Fusarium oxysporum* suggérant un rôle dans la réponse au stress biotique (Fan et al., 2017). Enfin, dans le raisin *Vitis vinifera L.*, cv Ugni blanc, VvPME1 participerait au ramolissement de la baie au cours du développement (Barnavon et al., 2001).

Pour nos constructions, nous sommes partis d'un clone isolé par Emilie Carpentier lors de son travail de thèse. La séquence de la *Lupme1* (Annexe 1) code pour une protéine de 551 acides aminés (Figure III.1). Elle est synthétisée sous forme d'une pré-pro protéine. La région « pré » possède un peptide signal de 23 acides aminés (Figure III.1, en bleu) permettant à la protéine d'entrée dans le système de sécrétion. La région « pro » est située entre le peptide signal et le second site de clivage RKLL (Figure III.1, en rouge) et possède un site potentiel de N-Glycosylation (Figure III.1, souligné). Enfin, la région mature a une taille de 327 acides

aminés dans laquelle on retrouve les courtes séquences caractéristiques des PME ainsi qu'un motif RGD (Arg-Gly-Asp) qui est retrouvé dans de nombreuses protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire.

Les deux acides aminés Q371 et D372 (Figure III.1, surlignés en jaune) sont essentiels à la fonction de déméthylation et leur mutation en Alanine rend l'enzyme inactive.

MSTFSHATTIPLIFVLLITTTSSTPTSSSSLHFSKSSRSSSSTNSKKALFEDSIMSTLAQAQSVLSSATALAMASTTQHDD
GPSDPSDIKTAVVGPTHDCLDLLEDTLEQLSNVAYRGHHDPTDVQTWLSAALTNQVTCKESLLLTKQSHHNKATILL
ETLAHNMTRTLGNSLALYVNHVMNDKYHNYPSSSRPVGGGGRKLLLTEDDNKFPAWLPAAKRKLLEASVGELEPH
AVVAKDGSGTHTSIAEAVRDVTAAAAVGTMADGGGGGSGVVYVKAGTYKENLNFKTKQKNVVLVGDGKGKTVIV
GSRNADDGSTTYDSATVAAMGDGFMARDLTIVNSAGPSKHQAVALRVGSDRAVIFRCSIQGYQDTLYTLSKRQFY
RETDIYGTVDFIFGNSAVVFQNCNIYTRSGSRGDNFITAQGRTDPNQNTGISIHNCRIESDGSGAKTYLGRPWKEYS
RTVVMQSVIGGHVASAGWAPWSGGFALKTLYYAEYMNSGPGAGISGRVSWPGYKGAVGPLEAGKFTVGQLIGG
NSWLPSTGVSFDAGLIGVS

Figure III.1: Séquence de la protéine LuPME1. Le peptide signal est indiqué en bleu. Le site de N-glycosylation présent dans la pro région (indiquée en noir) est souligné. Les deux sites de clivage RKLL prédits sont indiqués en rouge et la partie mature de la protéine est indiquée en vert avec le site actif QD surligné en jaune.

2. Constructions des fusions LuPME1-pHluorine

La déméthylation des HGs par les PMEs conduit au relargage de protons dans la paroi et impacte le pH environnant dans la paroi. Afin de limiter l'impact de la surexpression de la LuPME1 sur le pH de la paroi, la double mutation Q371A et D372A a été introduite dans la séquence de la LuPME1 (Figure III-1, surligné en jaune). En effet, ces deux acides aminés font partie d'une séquence caractéristique des PMEs : QDTL et leur mutation détruit l'activité catalytique de l'enzyme (Jenkins et al., 2001 ; Johansson et al., 2002).

Ainsi, deux fusions ont été réalisées avec la pHluorine: une avec une version supposée fonctionnelle de la LuPME1 et une avec une version mutée. Les fusions de la LuPME1 avec la pHluorine pour expression en plante ont été réalisées avec le système de clonage Golden Braid selon la grammaire NT-Fusion (https://gbcloning.upv.es/). La séquence de la preproLuPME1 a été clonée en position N-tag dans le vecteur d'entrée pUpD2 et séquencée. Elle a ensuite été assemblée dans le vecteur binaire pDGB3alpha1 avec le promoteur 35S, la séquence de la pHluorine en position CDS et le terminateur NOS (Annexe 2). Les fusions ainsi obtenues ont été nommées : LuPME1-pHluorine pour la version non modifiée et LuPME1mutée-pHluorine pour la version mutée.

3. Expression des fusions LuPME1 en épiderme de tabac

Afin de valider et d'étudier les fusions, les constructions présentées ci-dessus ont été exprimées transitoirement en épiderme de tabac *Nicotina tabacum*. Des échantillons de feuille sont prélevés pour étudier la localisation de la pHluorine au microscope confocal. 72h après infiltration, le marquage de la fusion LuPME1mutée-pHluorine est présent sous forme d'un signal fluorescent continu en périphérie des cellules épidermiques de tabac, comme attendu (Figure III.2A). L'intensité de fluorescence varie le long du contour cellulaire. Aucun signal fluorescent intracellulaire n'est détecté.

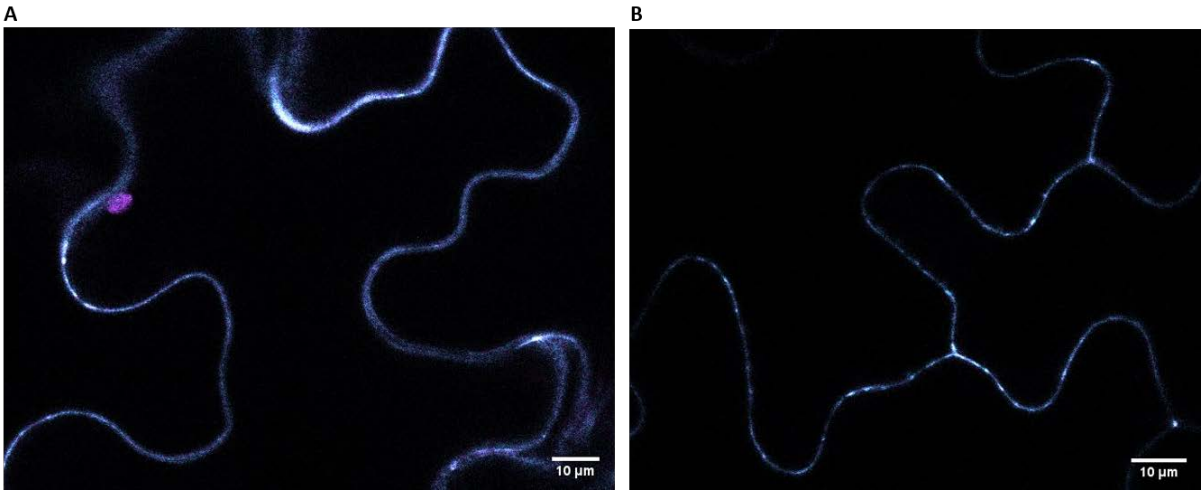


Figure III.2 : Observation au microscope confocal du marquage fluorescent de la fusion LuPME1mutée-pHluorine en A) et de la LuPME1-pHluorine en B) en épiderme de tabac 72h après transformation. Cyan signal à 476nm d'excitation, magenta signal à 496nm d'excitation.

La fusion LuPME1 fonctionnelle avec la pHluorine présente aussi un marquage exclusif en périphérie des cellules d'épiderme. A la différence de la forme mutée, la forme non modifiée montre un signal plus hétérogène avec la présence de points de forte intensité séparés par des zones présentant un signal de faible intensité (Figure III.2 B). A la jonction de trois cellules un signal fluorescent de forte intensité est présent.

Afin de valider l'intégrité de la fusion et sa maturation, des échantillons de feuille de de tabac transformées sont prélevés afin de réaliser un extrait total des protéines. Ces dernières sont séparées par électrophorèse SDS-Page puis transférées sur une membrane de nitrocellulose et un western blot est réalisé à l'aide d'anticorps anti-GFP. Comme présenté sur la Figure III.3 (puit 4), pour la forme LuPME1mutée-pHluorine, trois bandes sont immunomarquées. La bande de plus faible poids moléculaire est aux alentours de 61kDa, ce

qui correspond à la taille attendue de la forme mature de LuPME1mutée fusionnée à la pHluorine. Une seconde bande d'intensité équivalente migre à 63kDa et pourrait correspondre à une forme intermédiaire de la LuPME1mutée qui serait clivée seulement au niveau du 1er site de clivage RKLL. Enfin, une bande minoritaire de 85kDa est détectée et correspond à la taille prédite de la pré-pro forme de la LuPME1mutée-pHluorine.

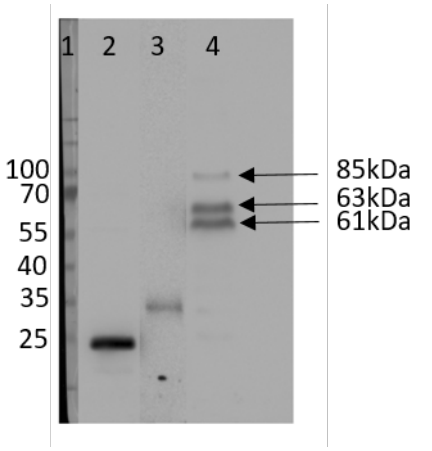


Figure III.3 : Analyse par Western blot de la fusion LuPME1mutée-pHluorine exprimée en épiderme de tabac. Un extrait total de protéines de feuille après 72h d'expression est soumis à une électrophorèse SDS-PAGE puis immunodétection avec des anticorps anti-GFP. Ligne 1 marqueur de poids moléculaire, ligne 2 pHluorine produite en *E.coli*, ligne 3 extrait total de feuille exprimant la PM-Apo-pHluorine, ligne4 extrait total exprimant la fusion LuPME1mut-pHluorine.

Afin d'affiner la localisation des deux fusions LuPME1, des plasmolyses ont été réalisées sur des feuilles de tabac 72h après infiltration, soit avec du glycérol 30% soit avec du $CaCl_2$ 0,5M. En outre, le $CaCl_2$ permet de déstabiliser les liaisons entre protéines et composants de la paroi et permet d'évaluer la force de la liaison (Jamet et al., 2006). Ces solutions hypertoniques vont entrainer des flux d'eau hors des cellules ce qui a pour effet de libérer un espace entre la membrane plasmique et la paroi. La solution de plasmolyse est infiltrée dans une portion de feuilles de tabac avec une seringue de 1ml après avoir blessé la feuille avec un cône. Le morceau de feuille est découpé et monté entre lame et lamelle avec la solution de plasmolyse.

Des observations ont été réalisées 20min après le début de la plasmolyse avec le glycérol 30% et sont présentées dans la figure III.4. On observe que la membrane plasmique (indiquée par une flèche blanche) s'est rétractée libérant un espace entre la membrane plasmique et la paroi où s'accumule la majorité du signal fluorescent de LuPME1mutée-

pHluorine (A) et LuPME1-pHluorine (B). On observe aussi occasionnellement un faible signal fluorescent dans l'espace apoplasmique.

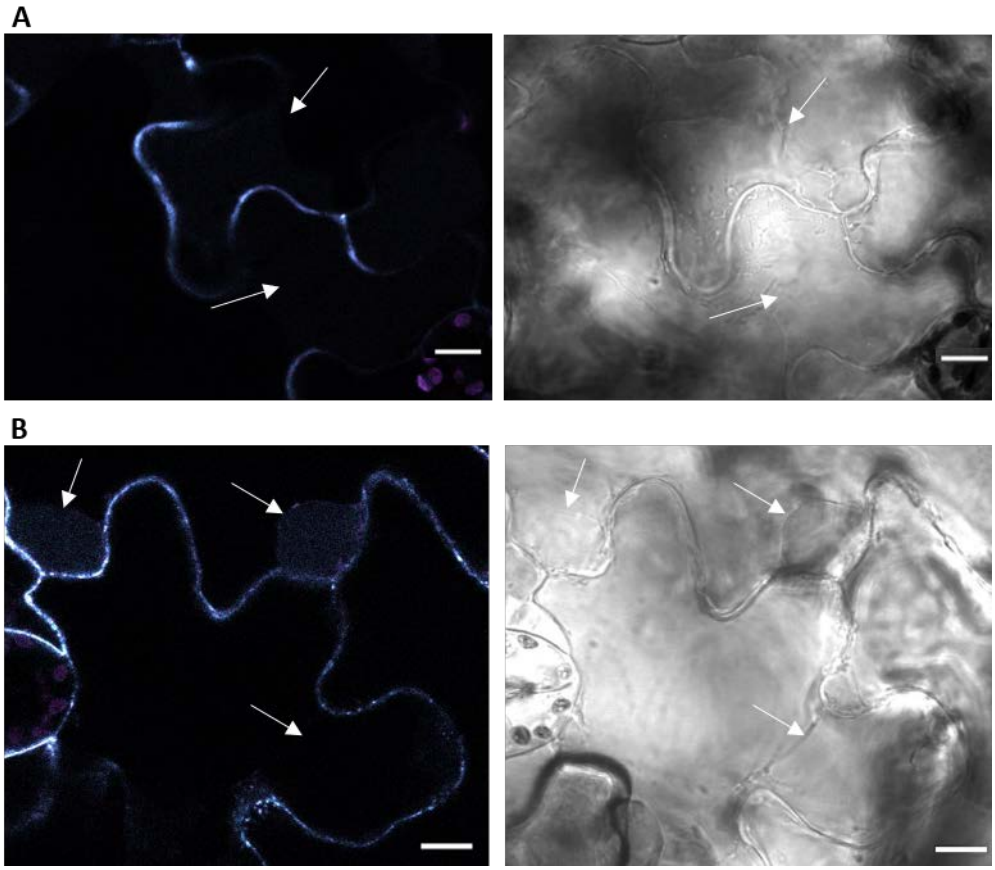


Figure III.4 : Localisation des fusions LuPME1mutée-pHluorine (A) et LuPME1-pHluorine (B) en épiderme de tabac après 20 minutes de plasmolyse avec du glycérol 30%. La membrane plasmique est indiquée par une flèche. Observation au microscope confocal 72h après transformation. Cyan signal à 476nm d'excitation, magenta signal à 496nm d'excitation. Echelle = 10µm.

De la même façon, des observations ont été réalisées 20min après le début de la plasmolyse avec du $CaCl_2$ 0,5M (Figure III.5). Comme avec le glycérol 30%, on observe la rétractation de la membrane plasmique (indiquée par une flèche blanche) et la localisation majoritaire du signal fluorescent des fusions LuPME1mutée-pHluorine (A) et LuPME1-pHluorine (B) au niveau de la paroi. Aussi, une faible proportion du signal fluorescent est retrouvée dans l'espace apoplasmique. Dans ces conditions d'observation, le $CaCl_2$ ne semble pas avoir plus d'effet que le glycérol sur la localisation des fusions ce qui suggère que le calcium n'est pas impliqué dans la liaison des LuPME1 à la paroi.

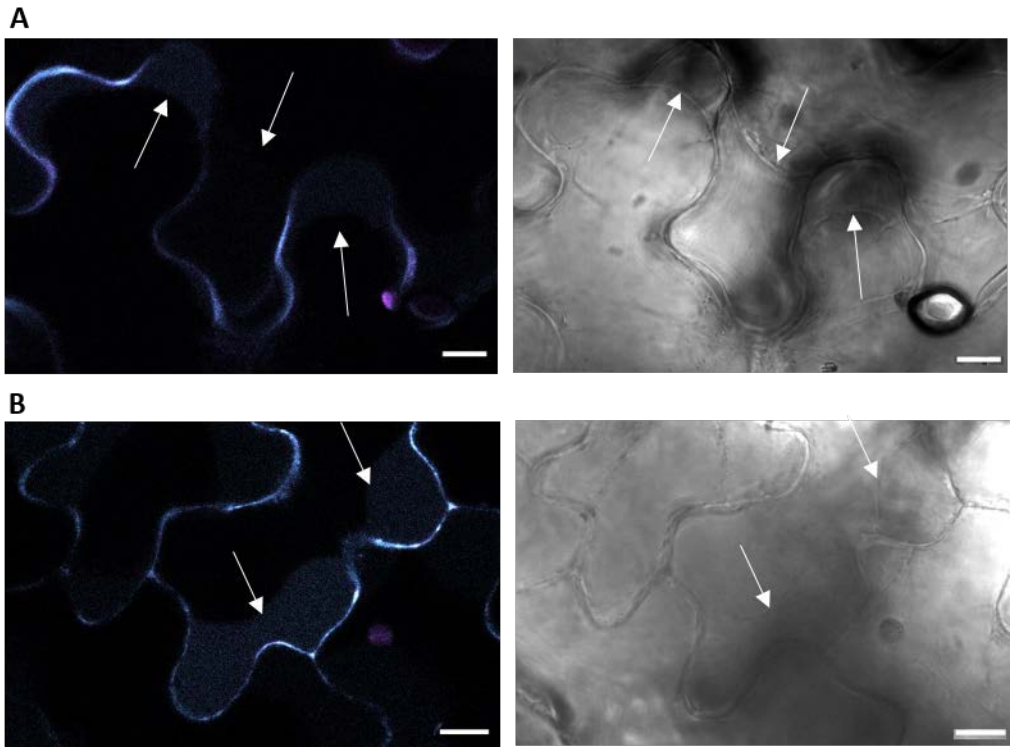


Figure III.5 : Localisation des fusions LuPME1mutée-pHluorine (A) et la LuPME1-pHluorine (B) en épiderme de tabac après 20 minutes de plasmolyse avec du $CaCl_2$ 0,5M. La membrane plasmique est indiquée par une flèche. Observation au microscope confocal 72h après transformation. Cyan signal à 476nm d'excitation, magenta signal à 496nm d'excitation. Echelle = 10µm.

4. Activité de la fusion LuPME1-pHluorine

Afin de déterminer si la LuPME1 possède une activité lorsqu'elle est fusionnée à la pHluorine, une fusion a été réalisée entre la séquence correspondant à la partie mature de la LuPME1 (à partir du deuxième site de clivage RKLL) et la pHluorine. Cette fusion a été générée par ligation/restriction, clonée dans le vecteur pRsetB (Annexe 3) et la séquence vérifiée par séquençage. Le vecteur pRsetB possède une étiquette composée de 7 histidines permettant de purifier la protéine de fusion produite dans *E coli*.

La production de la fusion HIS tag-LuPME1-pHluorine est réalisée dans des bactéries *E.Coli* BL21-pLysS sous contrôle du promoteur T7 inductible par l'IPTG pour produire une grande quantité de protéines recombinantes tout en limitant la toxicité pour les bactéries. La taille et l'intégrité de la fusion ont été testées par électrophorèse sur gel SDS-PAGE après purification sur colonne de Nickel. Les protéines sont ensuite révélées par western blot à l'aide d'anticorps anti GFP. Une bande d'une taille approximative de 62kDa est révélée

(Figure III.6). Elle correspond à la taille attendue de la fusion entre la pHluorine qui a une masse moléculaire de 27 kDa avec la forme mature de la LuPME1 qui a une taille prédite approximative de 35 kDa.

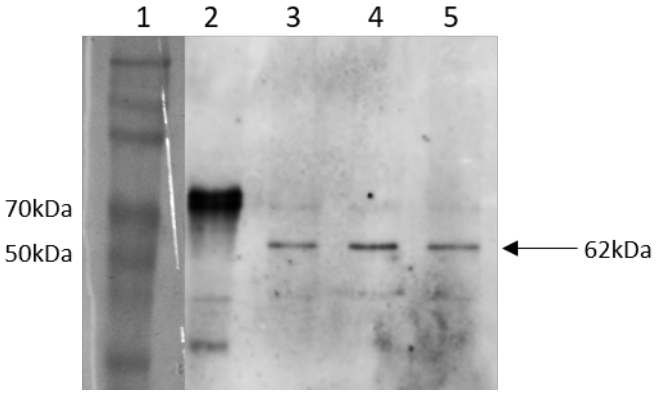


Figure III.6 : Analyse par western blot de la fusion LuPME1-pHluorine produite en bactérie et purifiée. Les fractions purifiées sont soumises à une électrophorèse SDS-PAGE puis immunodétection avec des anticorps anti-GFP. Ligne 1 marqueur de poids moléculaire, ligne 2 fraction non retenue, lignes 3 à 5 : 100ng des fractions successives de l'éluat.

L'étude de l'activité de la fusion LuPME1-pHluorine fait l'objet d'une collaboration avec Samantha Vernhettes de l'IJPB à Versailles et est actuellement en cours.

II. Fusion AT5G11420-pHluorine

1. Présentation

Le gène *At5g11420* code pour une protéine qui appartient à la famille DUF642 de protéines localisées dans la paroi. Cette famille est très conservée chez les plantes spermatophytes et son important niveau d'expression dans le testa suggère qu'elle serait impliquée dans de nombreux processus développementaux comme la germination des graines (Zùñiga-Sànchez et al., 2014). De plus, *At5g11420* est exprimé dans tous les tissus d'Arabidopsis (Zùñiga-Sànchez et Gamboa-de Buen, 2012). Dans la racine, son expression est maximale au niveau du cortex de la zone méristématique et de la zone de transition (Brady et al., 2007).

Le gène *At5g11420* possède 3 exons comme les autres membres de la famille DUF642 (Annexe 4). Il code pour une protéine de 366 acides aminés, d'une taille de 39 kDa et possédant un point isoélectrique de 7,84. Cette protéine possède un peptide signal de 22 acides aminées en N-terminal permettant son adressage dans le système de sécrétion. Elle est composée d'un domaine unique qui ne semble pas avoir d'activité catalytique et qui est divisé

en deux sous-domaines, un de fonction inconnue et un possédant des similarités avec le domaine de liaison au galactose (Figure III.7). Ce domaine spécifique des protéines appartenant à la famille DUF642 possède environ 30% d'acides aminés hydrophobes et est caractérisé par la présence conservée de 4 cystéines également retrouvées dans la séquence des PMEI et formant des ponts disulfures (Juge et al., 2006). Ce domaine a déjà été décrit dans des enzymes bactériennes hydrolysant les hémicelluloses et notamment les pectines (Mc Kie et al., 2001). On retrouve également un site de liaison à l'ATP/GTP qui est décrit dans de nombreuses protéines impliquées dans la transduction du signal mais n'est pas retrouvé dans toutes les protéines de la famille DUF642.

```
MKGGSLSFLFVLLIATITSVIC FSDGMLPNGDFELGPKPSDMKGTQVINKKAIPSWELSGFVEYIKSG 68
QKQGDMLLVVPAGKFAIRLGNEASIKQRLNVTKGMYYSLTFSAARTCAQDERLNISVAPDSGVIPIQT 136
VYSSSGWDLYAWAFQAESNVAEIVIHNPGEEEDPACGPLIDGVAIKALYPPRPTNKNILKNGGFEEGP 204
YVLPNATTGVLVPPFIEDDHSPLPAWMVESLKAIKYVDVEHFSVPQGRRAVELVAGKESAIAQVARTV 272
VGKTYVLSFAVGDANNACQGSMVVEAFAGKDTLKVPYESRGKGGFKRASLRFVAVSTRTRVMFYSTFY 340
SMRSDDFSSLCGPVIDDVKLLSARKP                                            366
```

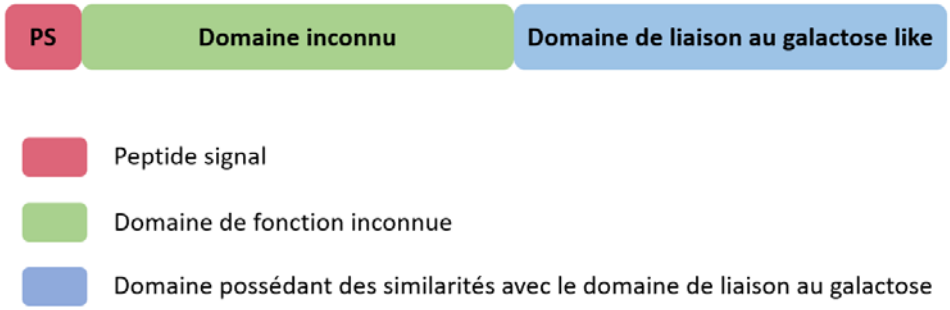


Figure III.7 : Séquence de la protéine AT5G11420 appartenant à la famille DUF642. A) Le peptide signal est présent en N-terminal (rouge), il est suivi d'un domaine de fonction inconnue (vert) puis d'un autre domaine qui présente des homologies avec le domaine de liaison carbohydrate (bleu). B) Représentation schématique de la protéine AT5G11420. D'après Zuñiga-Sànchez et Gomboa-de Buen, 2012.

2. Construction de la fusion AT5G11420-pHluorine

Afin d'adresser la pHluorine dans la paroi et de l'exprimer en plante, l'assemblage de la fusion AT5G11420 avec la pHluorine a été réalisée à l'aide du système Golden Braid. La séquence de l'*At5g11420* a été clonée en N-tag dans le vecteur d'entrée pUPD2 puis assemblée avec le promoteur 35S, la pHluorine et le terminateur NOS dans le vecteur binaire pDGB1alpha2 selon la grammaire NT-FUSION de Golden Braid

(https://gbcloning.upv.es/do/multipartite/). Cette unité transcriptionnelle a ensuite été assemblée avec un gène de résistance à l'hygromycine dans le vecteur binaire pDGB3omega1R (Annexe 5). Cette construction est utilisée pour transformer les feuilles de tabac et des Arabidopsis.

3. Localisation de la fusion AT5G11420-pHluorine

La localisation de la fusion AT5G11420-pHluorine a été étudiée au microscope confocal après expression en épiderme de tabac (*Nicotiana tabacum*). 72h après transformation, un signal fluorescent est observé au niveau de la majorité des cellules d'épiderme sur la totalité du contour avec une intensité variable (Figure III.8). Comme pour les autres fusions pariétales, un signal d'une forte intensité est retrouvé au niveau des jonctions entre trois cellules. En revanche, aucun signal intracellulaire n'est observé (Figure III.8).

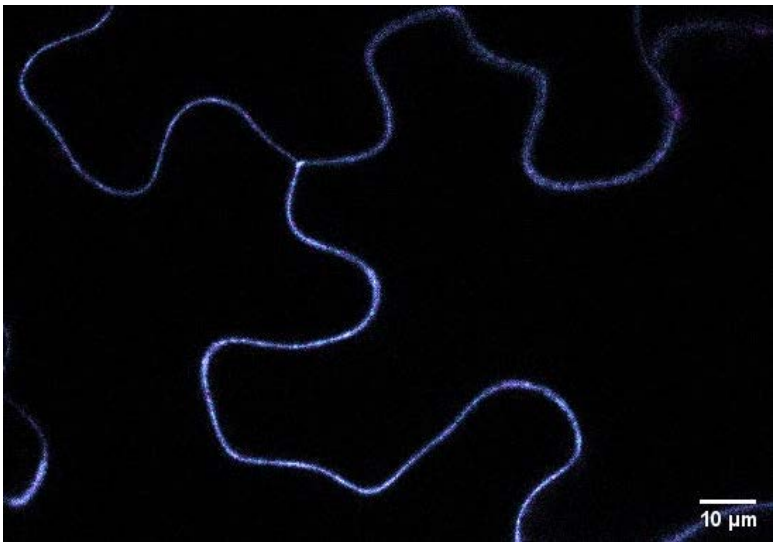


Figure III.8 : Expression de la fusion AT5G11420-pHluorine en épiderme de tabac. Observation au microscope confocal 72h après infiltration. Cyan signal à 476nm d'excitation, magenta signal à 496nm d'excitation.

Afin de préciser la localisation de la fusion AT5G11420-pHluorine en épiderme de tabac, des expériences de plasmolyse ont été réalisées avec du glycérol 30% et du CaCl2.

20min après le début de la plasmolyse avec du glycérol 30%, on observe la rétractation de la membrane plasmique indiquée par une flèche (Figure III.9). La majorité du signal fluorescent est retrouvé au niveau de la paroi alors qu'une petite fraction est libérée et retrouvée dans

l'espace apoplasmique entre la membrane plasmique et la paroi. Ce résultat confirme la localisation de la fusion AT5G11420-pHluorine dans la paroi en épiderme de tabac.

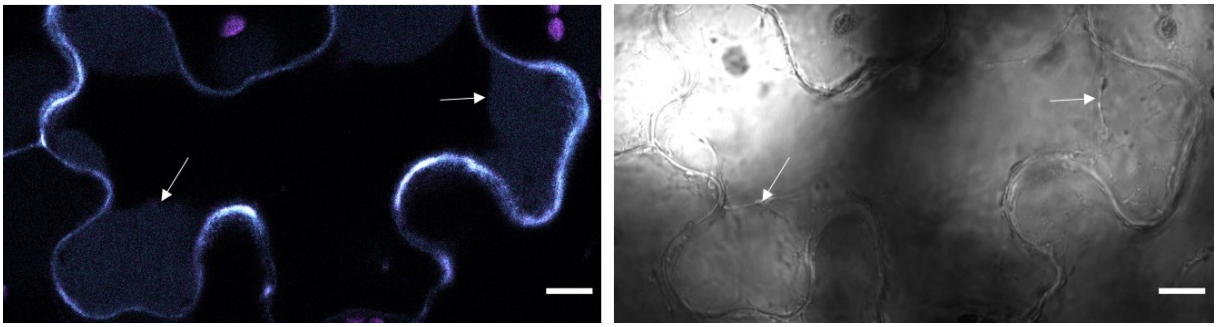


Figure III.9 : Localisation de la fusion AT5G11420-pHluorine en épiderme de tabac après 20 minutes de plasmolyse avec du glycérol 30%. La membrane plasmique est indiquée par une flèche. Observation au microscope confocal 72h après infiltration. Cyan signal à 476nm d'excitation, magenta signal à 496nm d'excitation. Echelle = 10µm.

Lorsque la plasmolyse est réalisée avec du $CaCl_2$, un résultat différent est observé. En effet, 20min après le début de la plasmolyse, une plus grande proportion de signal est retrouvée dans l'espace apoplasmique entre la MP (indiquée par une flèche) et la paroi. De plus, certaines zones de la paroi ne sont plus marquées et sont visibles en négatif (Figure III.10, étoile). Ce relargage partiel de la paroi suggère que le $CaCl_2$ affecte l'interaction entre la fusion AT5G11420-pHluorine et les composants de la paroi.

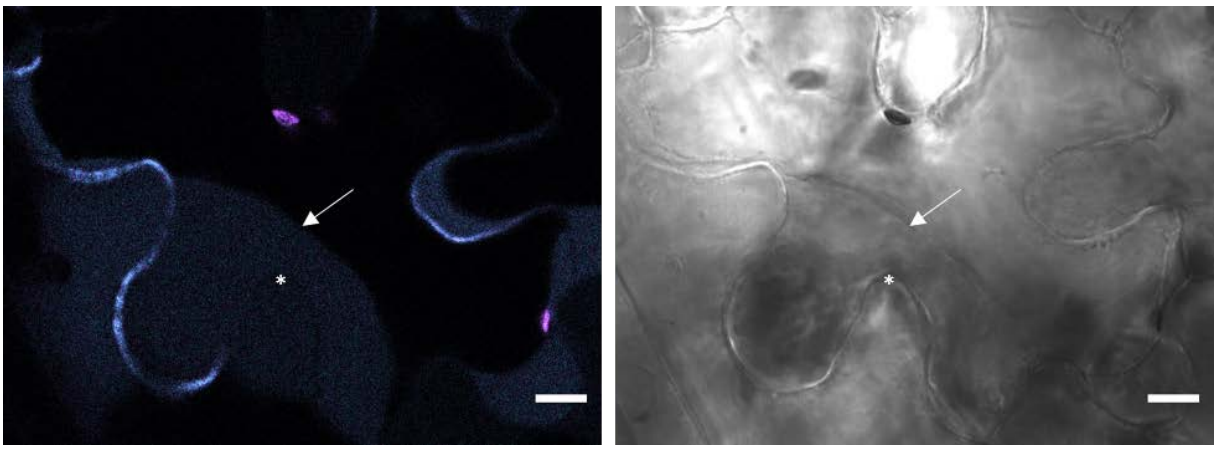


Figure III.10 : Localisation de la fusion AT5G11420-pHluorine en épiderme de tabac après 20 minutes de plasmolyse avec du $CaCl_2$ 0,5M. La membrane plasmique est indiquée par une flèche. Une portion de paroi non marquée est indiquée par une étoile. Observation au microscope confocal 72h après infiltration. Cyan signal à 476nm d'excitation, magenta signal à 496nm d'excitation. Echelle = 10µm.

4. Conclusions sur la localisation des fusions pariétales exprimées en épiderme de tabac

Lorsqu'elles sont exprimées transitoirement en épiderme de tabac, les trois fusions pariétales présentent un marquage en périphérie des cellules. De plus, aucun marquage intracellulaire n'est retrouvé. La fusion LuPME1-pHluorine présente une originalité comparée à la LuPME1mutée-pHluorine et l'AT5G11420-pHluorine : son marquage n'est pas continu mais sous forme de points avec des variations d'intensité de fluorescence. Lorsque l'on réalise une plasmolyse des cellules, on observe que le marquage fluorescent est présent le long d'une ligne en périphérie de l'espace apoplasmique et la cellule adjacente. Cette ligne correspond à la paroi. De plus, lorsque l'on regarde les jonctions entre les cellules, on s'aperçoit qu'elles sont remplies de signal fluorescent et qu'il y est intense (exemple de l'AT5G11420-pHluorine, Figure III.11 A). Enfin, les liaisons permettant aux fusions d'interagir avec les composants de la paroi semblent être différentes car seule l'AT5G11420 est décrochée de la paroi par le $CaCl_2$.

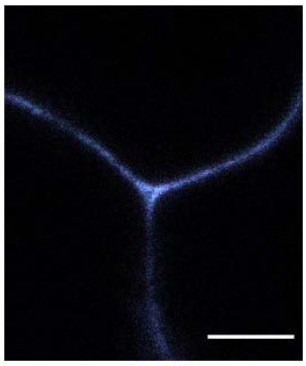


Figure III.11 : Localisation des fusions pariétales au niveau d'une jonction intercellulaire. Marquage obtenu avec la fusion AT5G11420-pHluorine.

III. Données de ratio de fluorescence obtenues par les fusions pariétales en tabac

Lorsque l'on compare les ratios de fluorescence des différentes fusions pariétales, on remarque que les fusions AT5G11420-pHluorine et LuPME1mutée-pHluorine présentent des ratios de fluorescence moyens similaires : 0,76 et 0,77 (Figure III.12). En revanche, ces ratios sont significativement différents de ceux mesurés avec la fusion LuPME1-pHluorine qui est plus faible : 0,70 et suggère un environnement de pH différent de celui estimé avec AT5G11420-pHluorine et LuPME1m-pHluorine. La forme mutée de la LuPME1 est donc associée à un environnement de pH plus acide que celui mesuré avec la version non mutée. Ce qui questionne sur une possible activité de la LuPME1 qui modifierait le pH environnant.

Enfin, lorsque l'on compare les 3 fusions pariétales avec la forme PM-Apo-pHluorine, on remarque que les ratios de fluorescence mesurés avec les fusions pariétales sont tous inférieurs à ceux enregistrés avec la PM-Apo. Ceci suggèrent une différence de pH entre la zone de l'apoplasme au contact de la membrane plasmique et celui de la paroi. Dans le but d'obtenir des informations de pH à partir des ratios de fluorescences enregistrés avec les fusions pariétales, une gamme de calibration *in situ* a été réalisée avec des réglages identiques. Malheureusement, seule la fusion PM-Apo est dans la gamme et correspond à un pH de 6,3 comme publié par Martinière et al., 2018. Par contre, les ratios de fluorescence mesurés avec les fusions pariétales sont pour leur moitié au moins en dessous de la gamme donc le pH ne peut qu'être estimé à une valeur inférieure à 5 ce qui indique que le pH dans la paroi est plus acide qu'à la membrane plasmique en épiderme de tabac.

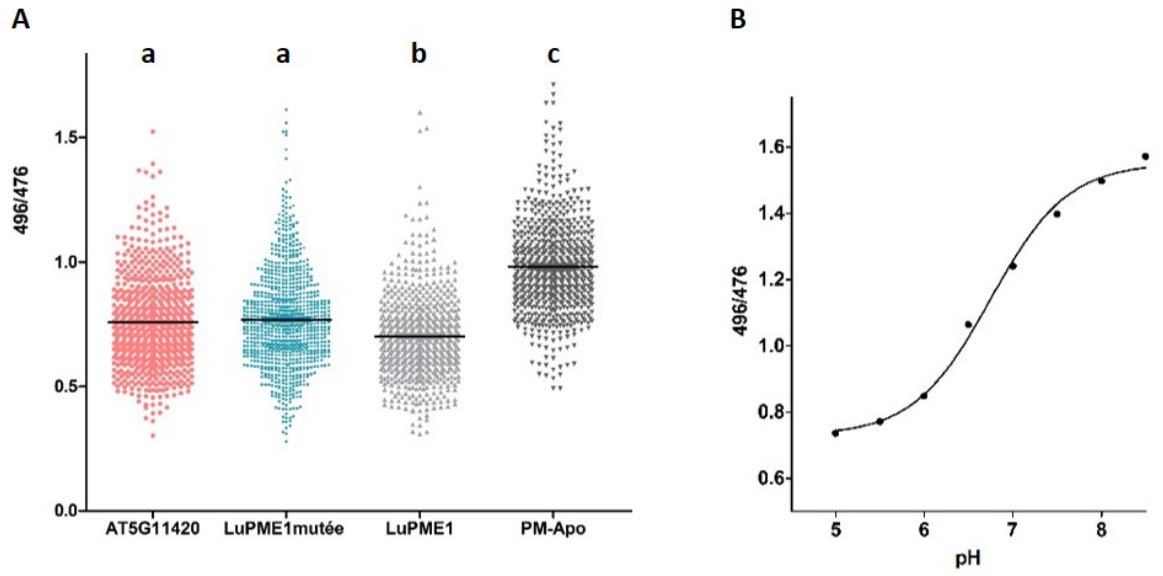


Figure III.12 : Hétérogénéité de ratios de fluorescence dans l'apoplasme. A) Ratios de fluorescence mesurés en épiderme de tabac avec les trois fusions pariétales : AT5G11420-pHluorine, LuPME1 et LuPME1mutée-pHluorine et la PM-Apo-pHluorine. Les lettres correspondent aux résultats du test de Tukey avec une significativité de $p<0,05$. B) Gamme de calibration *in situ* réalisée avec la pHluorine recombinante purifiée et les mêmes réglages que ceux utilisés pour l'obtention des ratios de fluorescence.

Enfin, les variations d'intensité du marquage fluorescent en contour des cellules d'épiderme de tabac n'affectent pas les ratios. En effet, lorsque l'on trace une ligne en contour d'une cellule exprimant la fusion AT5G11420 on observe une homogénéité des ratios de

fluorescence malgré les variations d'intensité de signal du senseur pour toutes les fusions pariétales comme illustré avec la fusion AT5G11420 (Figure II.13).

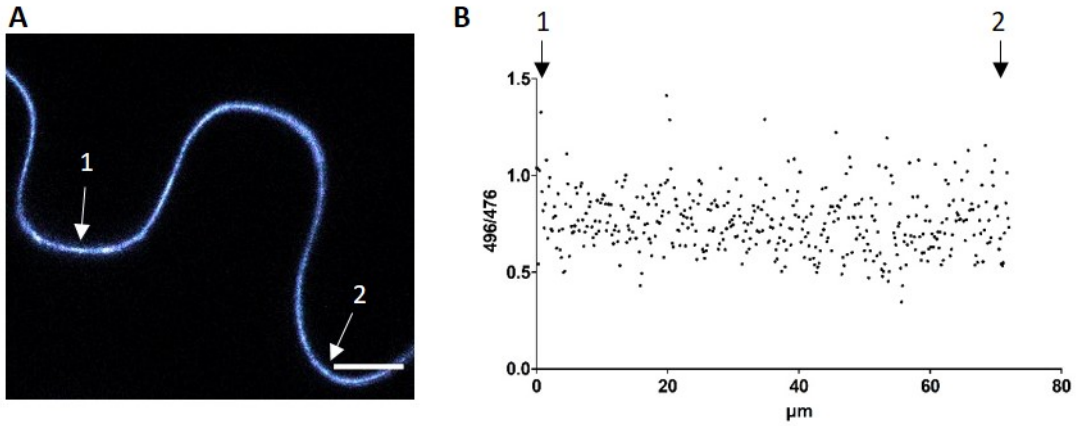


Figure III.13 : Mesure des ratios de fluorescence le long d'un lobe d'une cellule épidermale exprimant la fusion AT5G11420-pHluorine. A) Marquage fluorescent (496 magenta et 476 cyan), le chiffre 1 signale le début de la zone analysée et le chiffre 2 la fin de cette zone. B) Mesure des ratios de fluorescence le long du lobe.

Finalement, l'approche utilisée combinant les fusions pariétales avec la pHluorine et la calibration *in situ* n'a pas permis d'obtenir des valeurs de pH dans la paroi des cellules d'épiderme de tabac. Des analyses avec des fusions entre les LuPME1 et LuPME1mutée et les Acidines 2 et 4 sont en cours afin de déterminer lequel de ces deux senseurs seraient le plus adapté à l'environnement de pH de la paroi des cellules d'épiderme de tabac.

IV. Expression des fusions pariétales basées sur le pHluorine en Arabidopsis

1. Synthèse des lignées générées

Dans le but d'obtenir des informations de pH dans Arabidopsis, de nombreuses lignées exprimant les 5 formes apoplastiques, PM-Apo, Apo, LuPME1, LuPME1mutée et AT5G1420 ont été introduites en fusion avec la pHluorin ou les Acidines en complément des lignées publiées (Martinière 2018). Les lignées obtenues et disponibles à ce jour sont indiquées dans le tableau III.1.

	Promoteur	pHluorine	Acidine2	Acidine3	Acidine4
LuPME1mutée	UBQ		X		
	35S	X			
LuPME1	35S	X			
AT5G11420	35S	X			
PM-Apo	UBQ		X	X	X
	35S	X			
Apo	UBQ			X	X
	35S	X	X	X	

Tableau III.1 : Liste des lignées exprimant les Acidines ou la pHluorine sous le contrôle des promoteurs Ubiquitine 10 (UBQ10), 35S dans différents sous domaines de l'apoplasme : PM-Apo, Apo et dans la paroi (LuPME1, LuPME1mutée et AT5G11420).

La gamme de pH détectée par l'Acidine 4 (de pH4 à 7) en fait une candidate intéressante pour explorer le pH de la paroi. Ainsi, des lignées exprimant la LuPME1mutée-Acidine 4 sous contrôle du promoteur Ubiquitine (UBQ10) ont été produites. Malheureusement, la lignée exprimant la fusion LuPME1mutée-Acidine4 ne fluoresce pas dans la pointe racinaire. Les fusions avec l'Acidine 2 qui couvre la gamme de 2,5 à 5,5 devrait aussi permettre de couvrir les gammes de pH plus acide non atteignable par l'Acidine 4. Les fusions avec l'Acidine3 n'ont malheureusement pas pu être exploitées à cause d'une rétention importante du signal de la Gamillus dans le réticulum endoplasmique et dans la vacuole.

Les lignées exprimant les fusions protéine pariétale-pHluorine sont celles qui ont été générées en premier et ont été le plus exploitées et de ce fait seront les seules détaillées dans la suite de ce chapitre.

2. Phénotypage des lignées d'Arabidopsis exprimant les fusions pariétales

Les lignées transgéniques T2 exprimant les senseurs de pH pariétaux basés sur la pHluorine ont été criblées sur la base de leur fluorescence. Après amplification des générations T2 des lignées transgéniques exprimant les fusions pariétales LuPME1 et LuPME1mutée-pHluorine et AT5G11420-pHluorine, leur phénotype a été étudié après 6j de croissance sur un milieu MS sans vitamines, 1% de saccharose, MES pH5,8 et phytagel 0,8%. Sur la figure III.14 sont présentées des lignées exprimant les fusions pariétales qui un

phénotype représentatif des différentes lignées indépendantes dont nous disposons. Aucun phénotype visible n'a été détecté au niveau des cotylédons et de l'hypocotyle. En revanche, la croissance de la racine primaire semble affectée à différents niveaux pour chacune des fusions pariétales. Lorsque l'on compare les lignées exprimant les fusions pariétales avec le fond sauvage Columbia 8 (WT) et le contrôle PM-Apo pHluorine, on observe que les lignées AT5G11420-pHluorine présentent une racine primaire légèrement plus longue. La même tendance est observée avec les lignées LuPME1mutée-pHluorine alors que la lignée exprimant la LuPME1-pHluorine a une racine d'une longueur deux fois inférieure à celle du fond sauvage. L'inhibition de la croissance racinaire des lignées LuPME1 est encore plus marquée si l'on compare avec les lignées LuPME1mutée qui ont une racine près de 3 fois plus grande (Figure III.14). Cette différence de phénotype de croissance racinaire entre les deux les lignées LuPME1 / LuPME1mutée soutient l'hypothèse que la protéine est fonctionnelle.

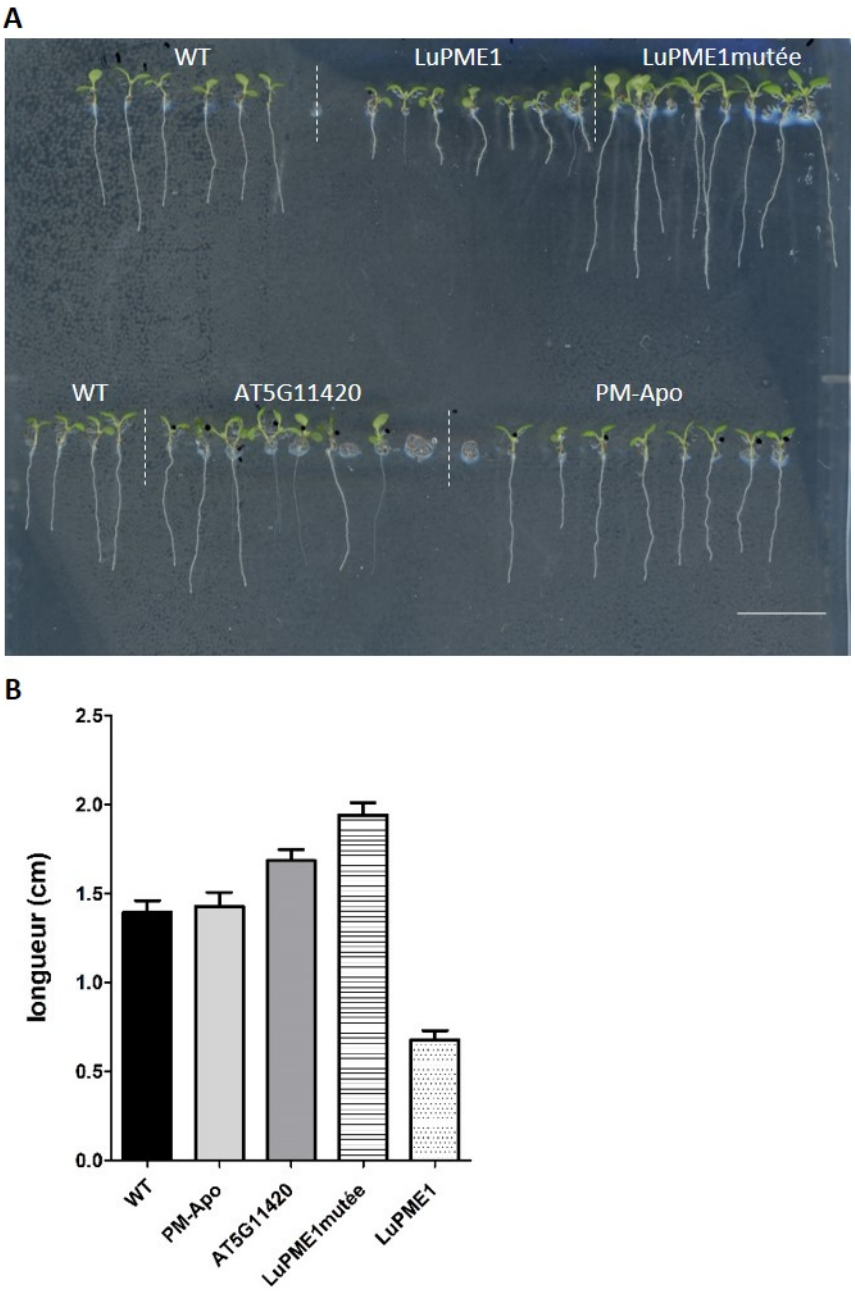


Figure III.14 : Phénotype de la racine primaire des lignées pariétales LuPME1-pHluorine, LuPME1mutée-pHluorine, AT5g11420-pHluorine et du contrôle PM-Apo pHluorine T2 de 6j ayant poussées sur un milieu MS sans vitamines, 1% saccharose, MES pH5,8 et phytagel 0,8%. A) Image des plantules exprimant stablement les fusions pariétales et les lignées contrôle WT et PM-Apo. Barre d'échelle 1cm. B) Mesure de la longueur de la racine primaire.

Lorsque l'on regarde le phénotype des racines à un niveau de détail supérieur, on ne remarque pas de phénotype particuliers pour l'émergence et la croissance des poils sauf pour la lignée LuPME1 où on n'observe pas de poil de taille intermédiaire entre les poils émergents

et les poils matures (Figure III.15). De plus, la lignée LuPME1 présente des poils racinaires très longs et très nombreux et très proches de la pointe racinaire.

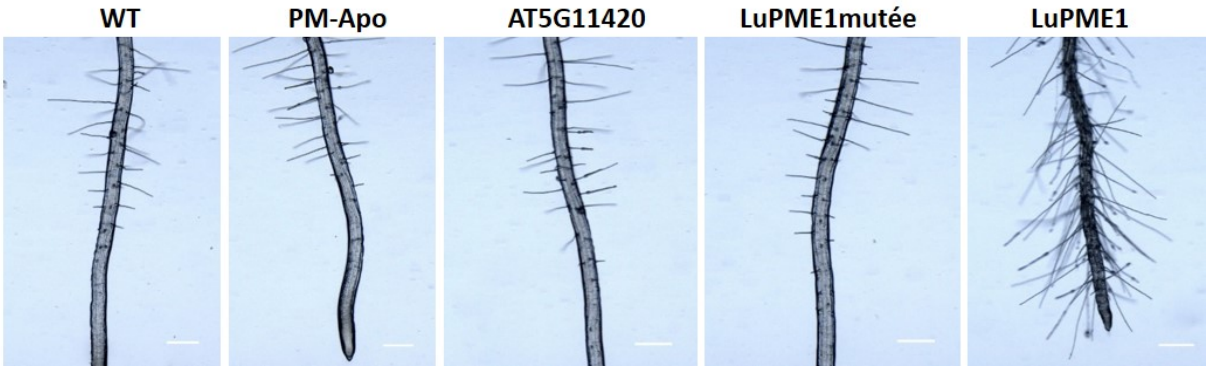


Figure III.15 : Phénotypage des poils racinaires des lignées contrôles sauvages (WT) et PM-Apo pHluorine et des lignées pariétales LuPME1-pHluorine, LuPME1mutée-pHluorine, AT5G11420-pHluorine de 6j ayant poussé sur un milieu MS sans vitamines, 1% saccharose, MES pH5,8 et phytagel 0 ;8%. Barre d'échelle = 200µm.

Dans le but d'étudier l'intégrité des fusions pariétales dans les plantes d'Arabidopsis stablement transformées, un western blot a été réalisé avec des anticorps anti GFP à partir d'extrait protéique de plantules de 6j.

Sur la figure III.16 illustrant le résultat du western blot, on retrouve les fusions pariétales dans les puits 4 à 9. Dans le puit n°5 correspondant à la lignée LuPME1mutée-pHluorine B, on retrouve 3 bandes de 56, 63 et 85 kDa qui correspondent respectivement à la taille attendue de la forme mature de la LuPME1mutée, la pro forme et la prépro forme combinée à la pHluorine. La bande représentant la fusion LuPME1mutée mature + pHluorine est plus intense que celles de la prépro et pro formes + pHluorine. De la même façon, trois bandes de 56, 63 et 85kDa sont retrouvées chez les lignées A et B exprimant la fusion LuPME1-pHluorine avec des bandes plus intenses pour la lignée B (puits 7 et 8). Ces bandes ne sont pas présentes dans la lignée C qui est faiblement fluorescente (puits 9). La fusion AT5G11420-pHluorine (puits n°6) présente une bande de 65kDa correspondant à la taille attendue de la protéine pariétale (39kDa) additionnée à la taille de la pHluorine. En revanche, Dans les lignées LuPME1mutée-pHluorine, on observe dans le puit n°4 un résultat similaire à celui obtenu avec le contrôle WT. Cette lignée présente un faible signal fluorescent et on peut supposer que la fusion est trop faiblement exprimée pour être détectée à partir de 10µg d'extrait total de protéines. Finalement, la LuPME1 mutée et non mutée est majoritairement présente sous forme mature dans la paroi des plantules d'Arabidopsis.

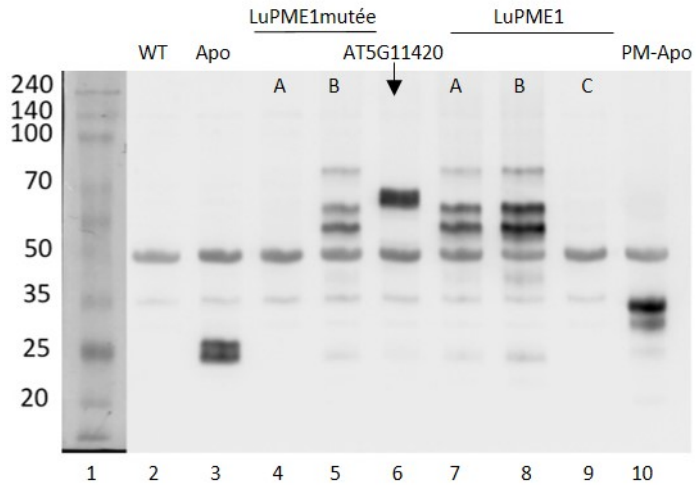


Figure III. 16: Analyse par western blot de la taille et l'intégrité des fusions pariétales pHluorine stablement exprimées dans des plantules d'Arabidopsis de 6j. Des extraits de protéines totales (10µg) sont déposés sur un gel SDS-PAGE et le senseur est révélé avec des anticorps anti GFP. Ligne 1 : marqueur de poids moléculaire. Ligne 2 : contrôle sauvage. Ligne 3 : Apo, version sécrétée de la pHluorine. Lignes 4 et 5 : Fusions LuPME1mutée-pHluorine des lignées A et B. Ligne 6 : Fusion AT5G11420-pHluorine. Lignes 7, 8 et 9 : Fusions LuPME1-pHluorine des lignées A, B et C. Ligne 10 : PM-Apo pHluorine.

3. Marquage fluorescent des plantules d'Arabidopsis exprimant stablement les fusions pariétales

Les lignées transgéniques T2 exprimant les senseurs de pH pariétaux ont été examinées au microscope confocal au niveau de la pointe de la racine primaire et des cotylédons afin de déterminer la localisation et la répartition de la fluorescence. Les lignées exprimant la LuPME1-pHluorine et la LuPME1mutée-pHluorine (Figure III.17 A et B, respectivement) présentent du signal fluorescent en contour de cellules dans tous les organes. Dans les cotylédons en Aa) et Ba), on peut observer de la fluorescence en contour des cellules de l'épiderme avec des zones où le signal semble plus intense et particulièrement au niveau des lobes. De la fluorescence est aussi détectée au niveau des stomates. Dans l'hypocotyle en Ab), et Bb) on observe un signal fluorescent mosaïque avec seulement une partie des cellules qui fluorescent. Au niveau de la partie mature de la racine et des poils racinaires en c), on retrouve du signal en contour de cellules et ce signal est plus intense au niveau de la pointe du poil racinaire. En revanche, pour les lignées exprimant la fusion AT5G11420-pHluorine, aucun marquage fluorescent n'est retrouvé dans les cotylédons et dans l'hypocotyle (Figure III.17 C. a et b). Au niveau des poils racinaires, la fluorescence est présente et comme pour les

autres lignées, le signal est plus intense au niveau de la pointe (Figure III.17 Cc). Le contrôle non transformé ne présente pas de signal fluorescent confirmant qu'avec les réglages utilisés, la fluorescence observée provient des fusions pariétales.

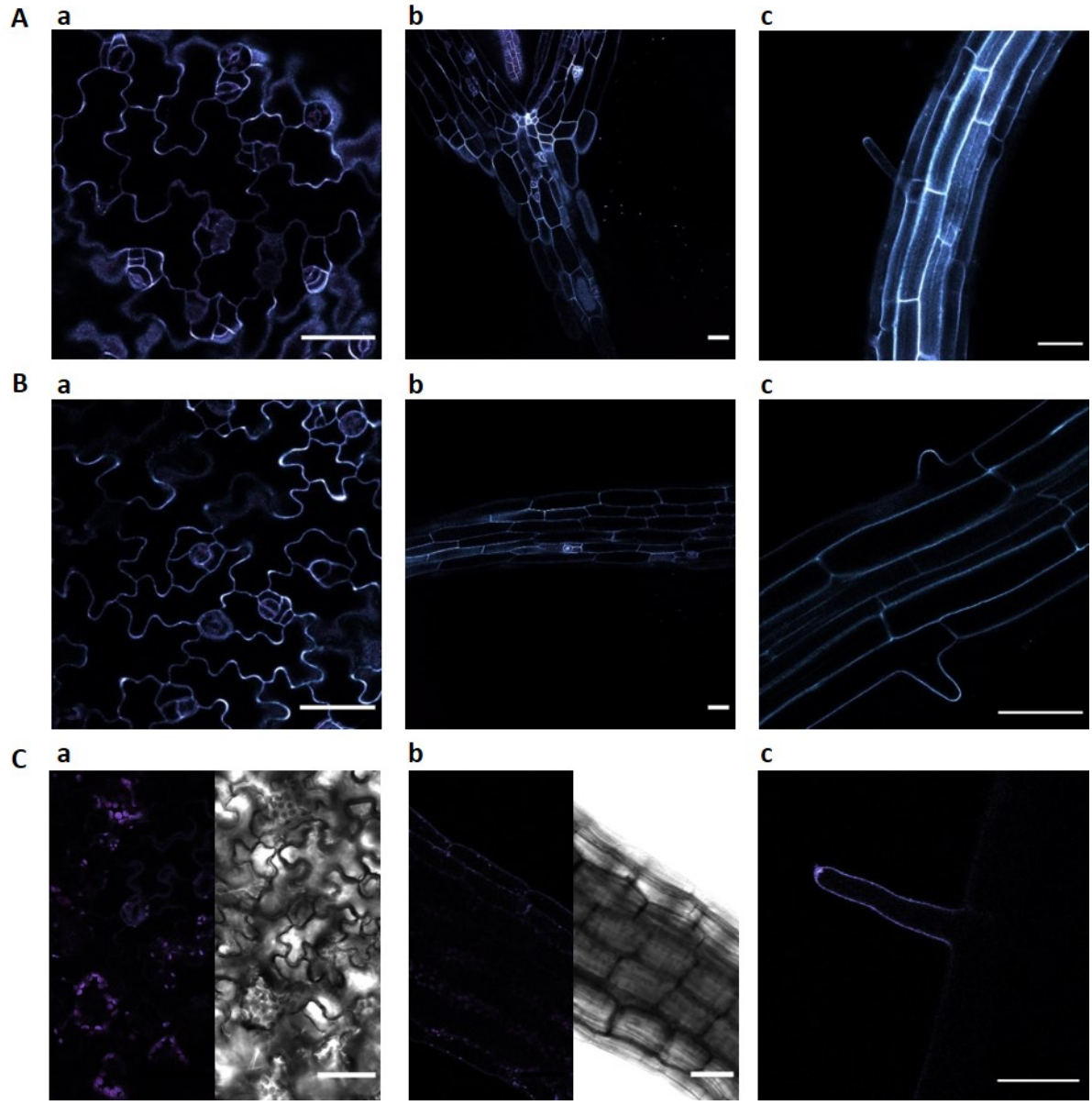


Figure III.17 : Patrons de fluorescence observés dans des lignées T2 avec des plantules de 6j exprimant la fusion PME1-pHluorine (A), PME1mutée-pHluorine (B) et AT5G11420-pHluorin (C). a) marquage fluorescent dans les cotylédons. b) Marquage dans l'hypocotyle et c) dans les poils racinaires. Cyan et magenta, fluorescence à 476nm et 496nm, respectivement. Les mêmes réglages ont été utilisés pour toutes les images. Barre d'échelle = 50µm.

Si l’on s’intéresse au marquage présent dans la pointe de la racine primaire des lignées exprimant les senseurs de pH pariétaux, on peut observer du signal fluorescent de l’extrémité de la pointe jusqu’aux cellules en élongation. Chaque couche cellulaire présente du signal et lorsque l’on projette le signal des différentes couches d’une série z (Z-stack), on obtient les images présentées dans la figure III.18. En A) une racine exprimant le LuPME1mutée-pHluorine, on peut observer un fort marquage fluorescent en contour de cellules dont l’intensité semble décroitre au niveau des faces longitudinales dans la zone d’élongation (EZ). En B), une racine exprimant la LuPME1-pHluorine qui est complétement désorganisée mais le patron de fluorescence ressemble à celui observé en A) à la différence que dans la zone d’élongation, le signal est majoritairement retrouvé sur les faces transversales des cellules et semble éteint au niveau des faces longitudinales. On observe aussi que les premières cellules de la zone d’élongation paraissent plus allongées que dans une racine exprimant la version mutée de la LuPME1. En C), une racine exprimant la fusion AT5G11420-pHluorine présente un patron de fluorescence différent de celui obtenu avec les fusions LuPME1 et LuPME1mutée. En effet, le signal fluorescent présent semble continu en contour de cellules. Il est très présent au niveau du méristème et de la zone de transition puis s’affaiblit dans la zone d’élongation.

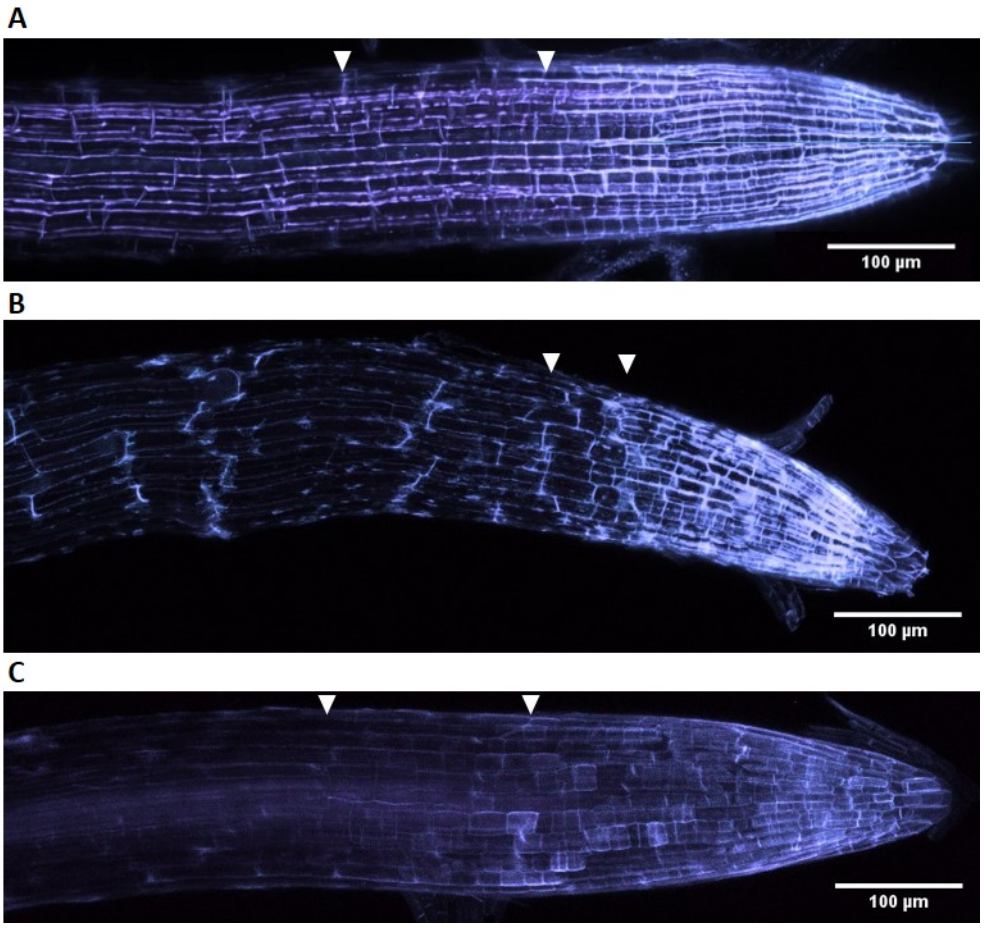


Figure III.18 : Patrons de fluorescence des fusions pariétales dans l'apex de racines primaires de 5 à 6j. Projection, z stack, du signal fluorescent des plans focaux obtenus au microscope confocal sur une série z de la pointe racinaire. A) LuPME1mutée-pHluorine, B) LuPME1-pHluorine C) AT5G11420-pHluorine. Cyan et magenta, fluorescence à 476nm et 496nm, respectivement. Les têtes de flèche indiquent la zone de transition.

Si l'on s'attarde sur le méristème (DZ) et la zone de transition (ZT) des fusions pariétales (Figure III.18, flèches), on observe d'importantes différences. En effet, on constate une taille moyenne de la DZ qui est similaire pour les fusions LuPME1mutée et AT5G11420 alors qu'elle est réduite de près de 30% pour la fusion LuPME1 (Figure III.19 A). La TZ semble encore plus affectée avec une taille réduite de presque un facteur 3 pour la fusion LuPME1 (Figure III.19 B).

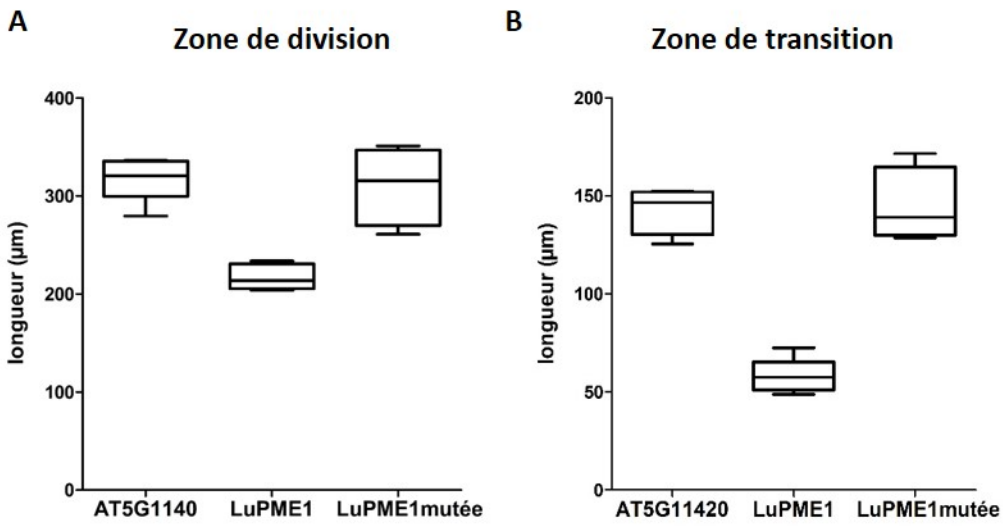


Figure III.19 : Comparaison des zones de division et de transition des différentes fusions pariétales. A) Zone de division. B) Zone de transition.

Si l'on compare plus finement les patrons de fluorescence de la pHluorine dans la zone de transition en version ancrée à la membrane plasmique (PM-Apo) en A), de la LuPME1mutée-pHluorine en B) et de la version sécrétée (Apo) en C) on s'aperçoit que la répartition et la localisation du signal fluorescent sont différentes pour chacune des localisations de l'apoplasme. En effet, la PM-Apo donne un signal homogène pour une même face de cellule avec une hétérogénéité d'intensité de signal entre les faces longitudinales et transversales. La LuPME1mutée permet d'obtenir un signal en contour de cellules et des poches de forte intensité de fluorescence à l'intersection des cellules. La fluorescence de la version sécrétée Apo est détectée uniquement dans des poches aux coins des cellules (Figure III.20 C). Lorsque l'on réalise une projection orthogonale à partir d'une série Z, la disparité de patron de fluorescence est encore plus parlante. En effet, on observe pour la PM-Apo (D) un marquage continu en contour de cellules de l'épiderme et du cortex. Pour la LuPME1mutée-pHluorine (E), on voit de la fluorescence en contour des cellules de l'épiderme ainsi que des poches entre les cellules épidermales. Ces poches sont aussi visibles à l'intersection des cellules de l'épiderme et du cortex et entre les cellules du cortex. Enfin dans l'Apo-pHluorine (F) des poches fluorescentes sont visibles entre les cellules de l'épiderme et du cortex et entre les cellules du cortex. On note qu'il n'y a pas de marquage en surface de l'épiderme en raison d'une diffusion du senseur Apo hors de la racine (Figure III.20 F, flèche). Par contre, de manière intéressante, la fusion pariétale est bien détectée à l'extérieur de l'épiderme (Figure III.20 E, flèche) comme la PM-Apo, ce qui suggère que la fusion pariétale ne diffuse pas dans le milieu comme la fusion ancrée à la membrane plasmique.

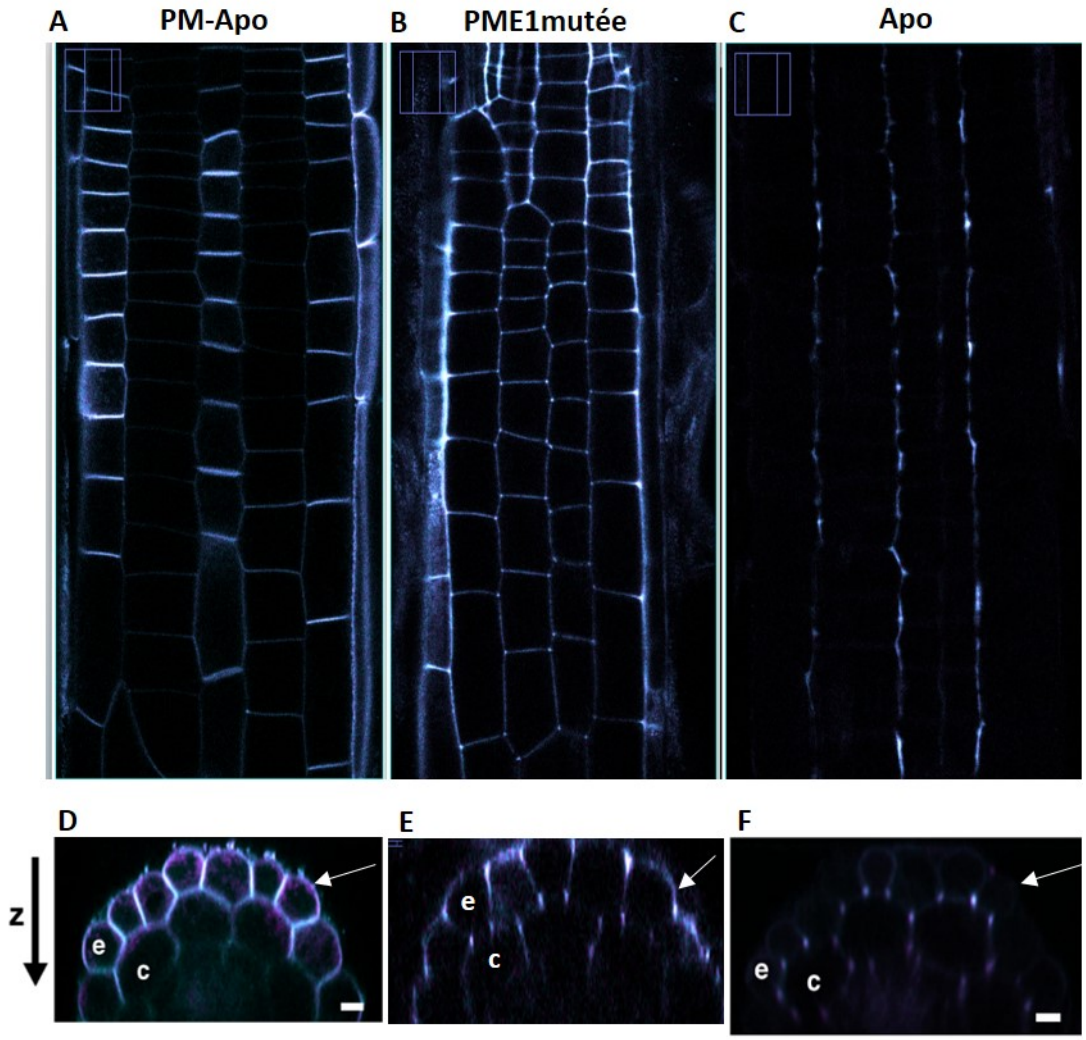


Figure III.20 : Patrons de fluorescence dans la zone de transition avec la pHluorine ancrée à la membrane plasmique (PM-Apo), adressée à la paroi (LuPME1mutée) et sécrétée dans l'apoplasme (Apo). (A→ C) Vue longitudinale et (D → F) Sections orthogonales. (A et D) PM-Apo, (B et E) LuPME1mutée et (C et F) Apo. Observation au microscope confocal de plantules de 5j. Cyan et magenta, fluorescence à 476nm et 496nm, respectivement. Echelle= 10µm.

Si l'on regarde en détail l'allongement des cellules dans la zone de transition en prenant comme repère la dernière cellule de la zone méristématique (cellule annotée d'un « 1 » sur la Figure III.21 A), on observe un allongement progressif chez les plantes exprimant la LuPME1mutée dont la longueur est doublée à la 4ème cellule (annotée d'un « 5 ») (Figure III.21 C). Chez les plantes exprimant la LuPME1-pHluorine (Figure III.21 B et C), l'allongement est très rapide et seulement deux cellules suffisent pour doubler la longueur de la face longitudinale. L'expression de la fusion LuPME1 en Arabidopsis a donc un effet sur

la croissance de la racine, primaire, l'élongation des cellules dans la pointe et sur la croissance des poils racinaires.

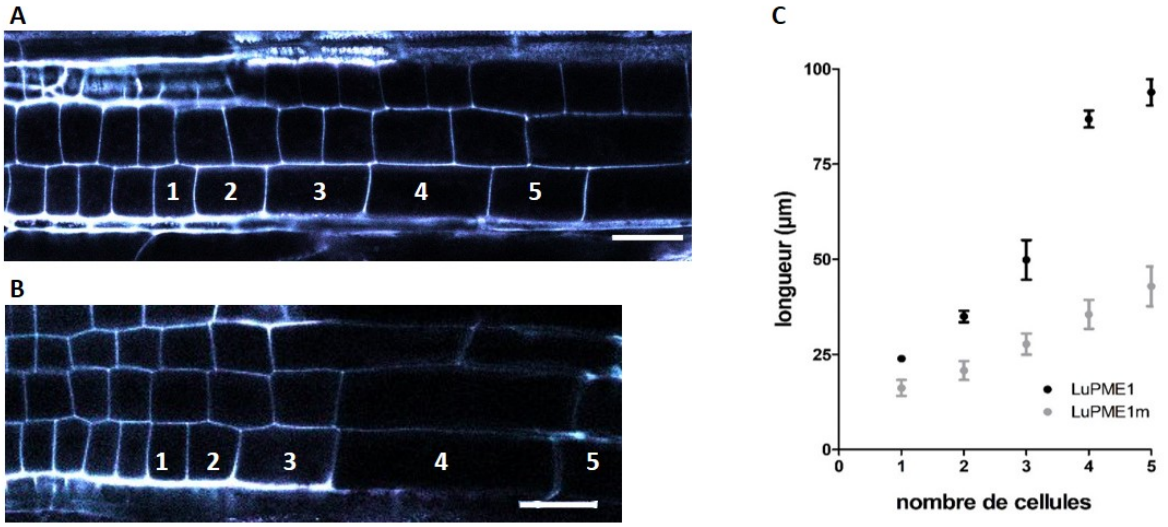


Figure III.21 : Comparaison de la zone de transition d'une plantule exprimant la version LuPME1mutée-pHluorine en A) et la LuPME1-pHluorine en B). Observation au microscope confocal de plantules de 5j. Cyan = fluorescence à 476nm et magenta = fluorescence à 496nm. C) Allongement des cellules dans la zone de transition (LuPME1 en noir, LuPME1mutée en gris). n=5.

Afin d'obtenir plus d'information sur le type de paroi marqué par nos fusions pariétales, nous nous sommes focalisés sur l'apex de la racine et à la coiffe des racines, où on observe des patrons de fluorescence très différents d'une fusion à l'autre (Figure III.22). Compte tenu du fait que la version non mutée de la LuPME1-pHluorine entraine une forte désorganisation de l'apex racinaire, elle a été exclue des analyses de marquage fluorescent au niveau de la coiffe.

Avec la fusion LuPME1mutée-pHluorine (Figure III.22 A), on observe du signal au niveau des faces longitudinales internes des cellules de la coiffe. En revanche, aucun signal fluorescent n'est retrouvé au niveau de la face longitudinale externe des cellules de la columelle et des cellules latérales de la coiffe. Avec la fusion AT5G11420-pHluorine, on retrouve un marquage fluorescent au niveau des faces longitudinales et transversales des

cellules de la columelle et des cellules latérales de la coiffe (Figure III.22 B). Il y a également un faible signal à l'interface des cellules de la coiffe et des cellules de l'épiderme.

Une partie de la fluorescence de la LuPME1mutée et AT5G11420-pHluorine se retrouve dans les mêmes zones cellulaires de la coiffe. Cependant, on retrouve une nette différence de marquage au niveau de la face longitudinale externe des cellules de la columelle et des cellules latérales de la coiffe où on retrouve un marquage exclusif de l'AT5G11420-pHluorine. Ces données suggèrent que ces deux senseurs de pH pariétaux ne sont pas strictement localisés dans le même type de paroi.

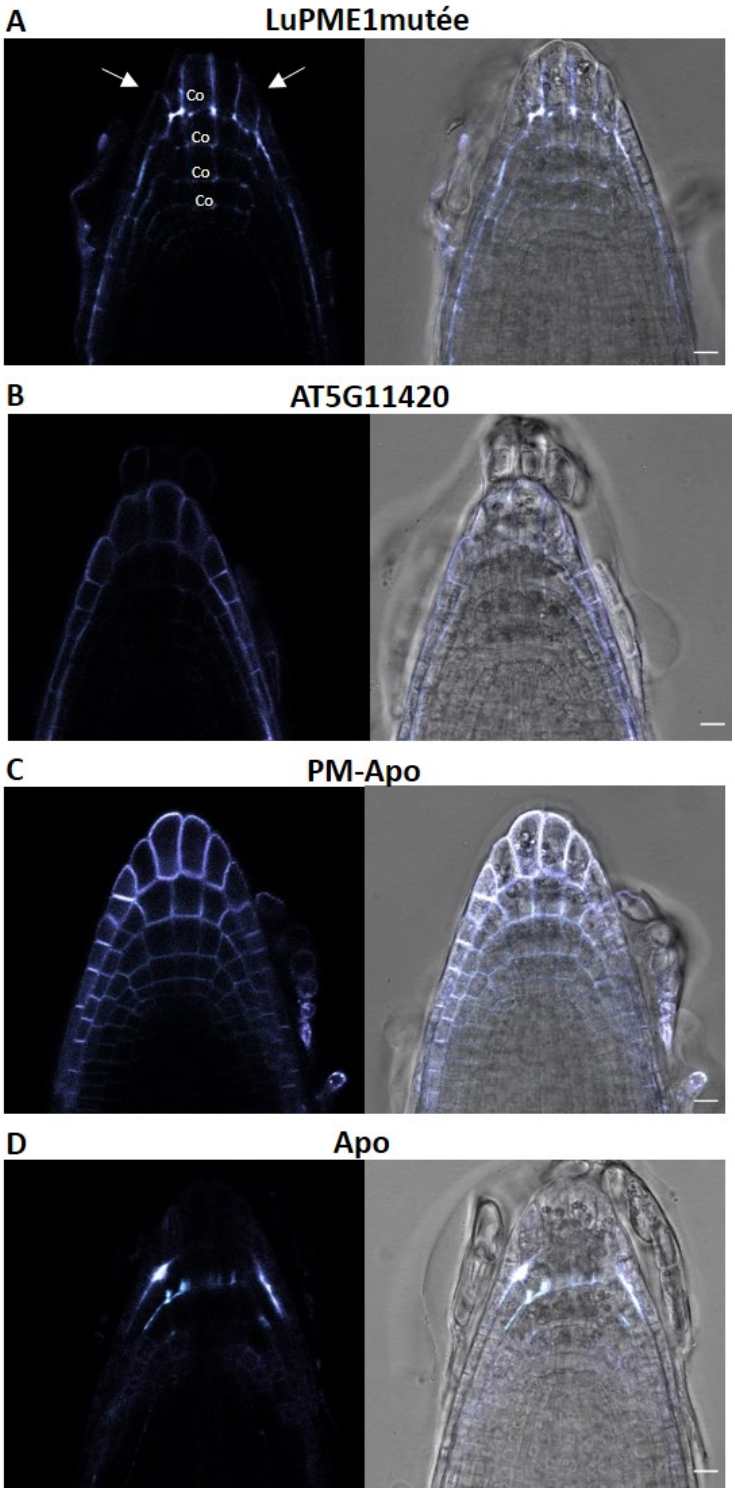


Figure III.22 : Marquages de la paroi obtenus dans la coiffe des racines primaires d'Arabidopsis de 5j pour les lignées exprimant A) LuPME1mutée-pHluorine, B) AT5G11420-pHluorine, C) PM-Apo et D) Apo-pHluorine. Co = columelle et les flèches blanches indiquent les 1ères cellules latérales de la coiffe. Observation au microscope confocal de plantules de 5j. Cyan = fluorescence à 476nm et magenta = fluorescence à 496nm. Echelle = 10µm.

Dans le but d'affiner la localisation des fusions pariétales dans la coiffe, des marquages ont été réalisés avec du COS^{647}, une sonde qui a une forte affinité pour les HGs hautement déméthylés (Mraveck et al., 2014). On retrouve un fort marquage en périphérie des cellules de la columelle et des cellules latérales de la coiffe. Ce résultat suggère une forte concentration d'HGs fortement déméthylés dans les cellules de la columelle et dans les cellules latérales de la coiffe. Si on superpose le marquage au COS^{647} avec le patron d'expression de la PM-Apo, on observe le signal du COS^{647} (en rouge) entre les zones marquées par le senseur de pH (violet) (Figure III.23) au niveau des cellules de la columelle. Lorsque l'on compare le marquage obtenu avec l'Apo-pHluorine on remarque une colocalisation au niveau des poches intercellulaires entre les cellules de la coiffe et de l'épiderme bien que la fluorescence du COS^{647} soit faible dans ces régions (Figure III.23 B). Dans la coiffe d'une LuPME1mutée-pHluorine, on peut observer une colocalisation avec le marquage au COS^{647} à l'intersection entre les cellules de la columelle et l'épiderme et entre les cellules de l'épiderme et du cortex (Figure III.23 C). Enfin, dans la coiffe d'une AT5G11420-pHluorine une forte colocalisation avec le COS^{647} au niveau de la face latérale extérieure des cellules de la columelle et des cellules latérales de la coiffe (Figure III.23 D). Ces données renforcent l'idée que les fusions LuPME1mutée-pHluorine en AT5g11420 sont localisées dans la paroi pectinique. L'AT5G11420-pHluorine est localisée dans la paroi des cellules de la columelle qui semble composée d'HGs fortement déméthylés compte tenu de l'intensité du marquage au COS^{647}. En revanche, la LuPME1mutée-pHluorine est moins associée au marquage au COS^{647} et l'est principalement au niveau de l'intersection des cellules de la coiffe, de l'épiderme et du cortex.

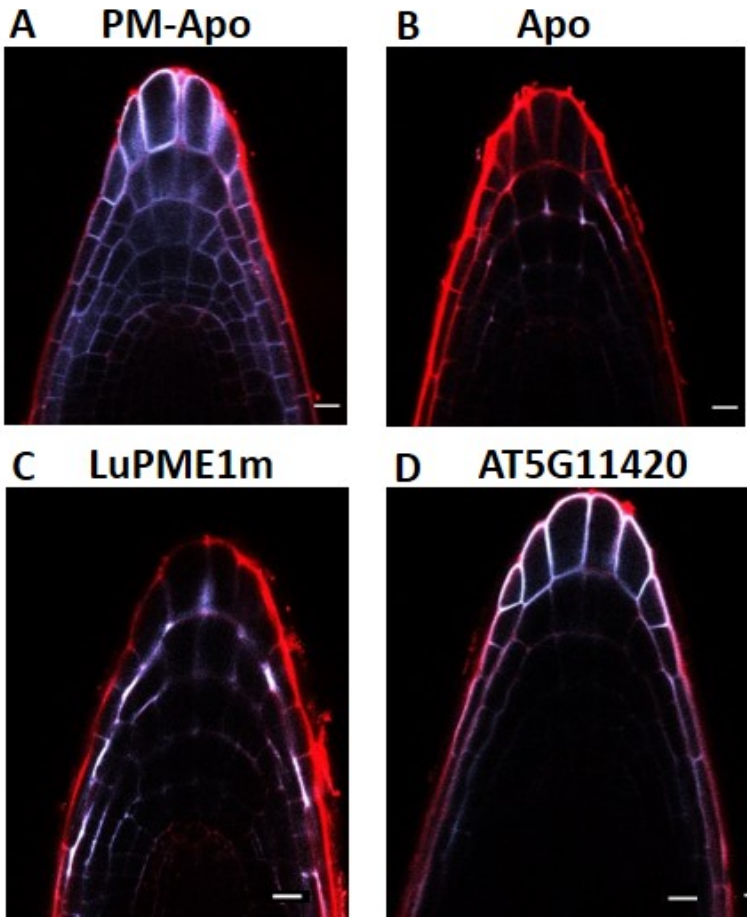


Figure III.23 : Marquage des HGs déméthylés de la coiffe par le COS^{647} et des régions pariétales couvertes par les senseurs de pH pariétaux. A) PM-Apo B) Apo-pHluorine C) LuPME1m-pHluorine et D) AT5G11420-pHluorine. Observation au microscope confocal de plantules de 5j. Cyan = fluorescence à 476nm, magenta = fluorescence à 496nm et rouge = COS^{647}. Echelle = 10µm.

Pour aller plus loin dans la caractérisation des parois marquées par les fusions pariétales, le pH a été évalué à la face transversale des cellules de la columelle qui est marquée par les deux senseurs. Nous avons donc analysé les ratios de fluorescence (496/476) dans cette région (Figure III.24). La LuPME1mutée-pHluorine donne un ratio moyen de 0,88 qui est significativement différent de celui mesuré avec l'AT5G11420-pHluorine qui est plus faible (0,68) et de celui mesuré avec le contrôle PM-Apo qui est légèrement supérieur : 0,94. La différence de ratio de fluorescence mesurée avec la LuPME1mutée-pHluorine et l'AT5g11420 suggère un environnement de pH différent et soutient l'hypothèse d'une localisation ou un micro-environnement différent pour ces deux fusions pariétales. Les ratios de fluorescence obtenus sont pour la plupart en dessous de la gamme de calibration *in situ* et n'ont pas permis d'obtenir des valeurs de pH.

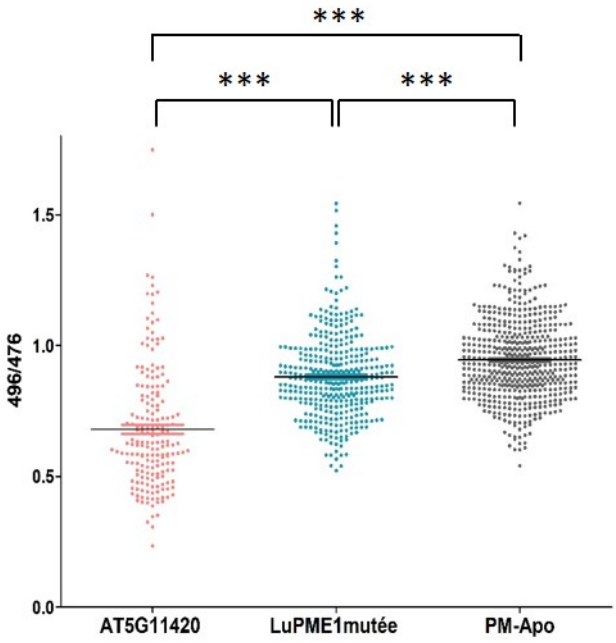


Figure III.24 : Ratios de fluorescence mesurés dans la face transversale des cellules de la columelle des senseurs de pH pariétaux AT5G11420-pHluorine et LuPME1m-pHluorine vs PM-Apo pHluorine. Test de tukey, p<0,001.

V. Calibration *in vivo* dans la racine d'Arabidopsis pour l'obtention d'informations de pH

De manière à obtenir des informations de pH avec les senseurs pariétaux, des observations et des gammes de calibrations *in vivo* ont été réalisées sur des racines d'Arabidopsis. Les plantules de 5j exprimant les senseurs pariétaux sont observées avec un microscope à épifluorescence équipé d'un objectif 10X permettant de collecter des ratios de fluorescence dans les différentes zones de la pointe de la LuPME1mutée-pHluorine (Figure III.25 A) et de l'AT5G11420-pHluorine (Figure III.25 C). La taille de la pointe racinaire de la LuPME1-pHluorine étant raccourcie, on peut observer la DZ, ce qui semble être la TZ et une partie plus étendue de l'EZ (Figure III.25 B).

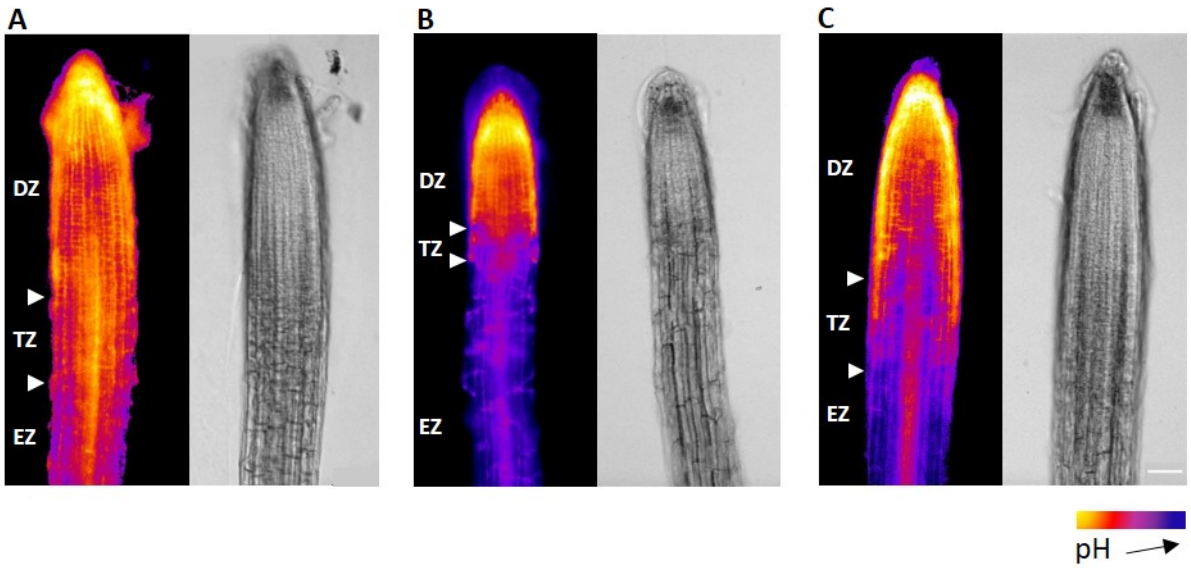


Figure III.25 : Images ratiométriques des pointes racinaires des plantules d'Arabidopsis de 5j exprimant les fusions pariétales A) LuPME1mutée- pHluorine, B) LuPME1-pHluorine, C) Fusion AT5G11420. Les images ratiométriques sont obtenues en divisant l'image à 390nm par celle obtenue à 475nm. Observation au microscope ratiométrique, grossissement 10X, barre d'échelle 50µm.

Afin de déterminer la distribution des pH le long de la pointe racinaire, des profils de ratios de fluorescence longitudinaux ont été réalisés à partir du signal fluorescent collecté sur toute l'épaisseur de la racine. De plus, compte tenu de la désorganisation de la pointe racinaire des plantules exprimant la LuPME1-pHluorine, les données la concernant sont présentées dans un second temps.

Dans la figure III.25, sont représentés les ratios de fluorescence mesurés dans des pointes racinaires de plantules exprimant la LuPME1mutée-pHluorine et l'AT5g11420-pHluorine en comparaison avec le profil obtenu avec la PM-Apo pHluorine. Des profils similaires sont observés avec une chute brutale des ratios de fluorescence (390/475) dans la coiffe qui remonte dans la DZ pour former un sommet qui atteint une valeur de 0,97 pour la fusion AT5G11420 et 0,86 pour la LuPME1mutée. Les ratios se stabilisent ensuite pour la LuPME1mutée-pHluorine et remonte à partir de la moitié de la zone de transition et d'élongation pour atteindre 0,91. Pour l'AT5G11420, les ratios remontent graduellement de la fin de la DZ au début de l'EZ où ils atteignent une valeur de 1,1. Globalement, les ratios obtenus avec le senseur AT5G11420-pHluorine sont plus élevés que ceux mesurés avec la LuPME1mutée-pHluorine. Les ratios donnés par la PM-Apo se superposent quasiment à ceux de la LuPME1mutée-pHluorine à partir de la moitié de la DZ.

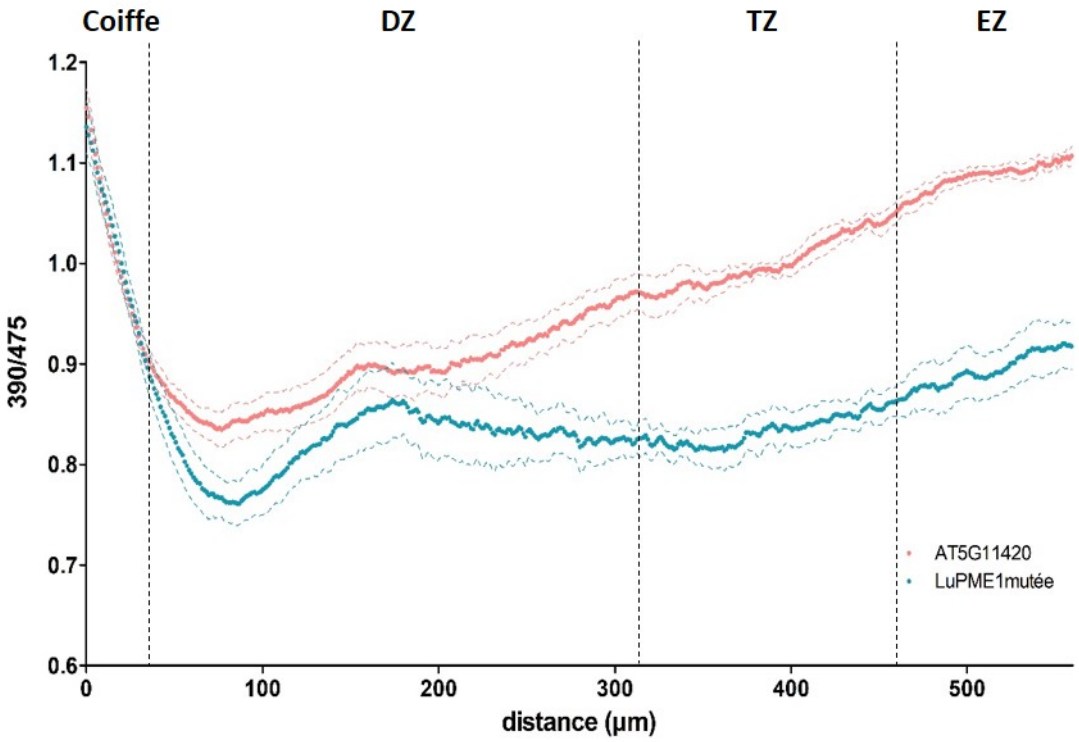


Figure III.26 : Profil longitudinal des ratios de fluorescence moyens (390/475) de racines d'Arabidopsis exprimant les fusions LuPME1mutée-pHluorine (bleu), AT5G11420-pHluorine (rouge) ou la PM-Apo (noir). Observation au microscope ratiométrique. n = 4 à 5.

Dans les racines exprimant la LuPME1-pHluorine, les ratios de fluorescence (390/475) chutent brutalement dans la coiffe pour atteindre 0,45 en début de DZ puis augmentent progressivement jusqu'à 0,8 en fin de TZ et se stabilisent à cette valeur-là dans l'EZ (Figure III.26). Dans la coiffe et la DZ, les ratios enregistrés avec la LuPME1 sont plus faibles que ceux obtenus avec la LuPME1mutée. En revanche, ils semblent proches dans la TZ et l'EZ.

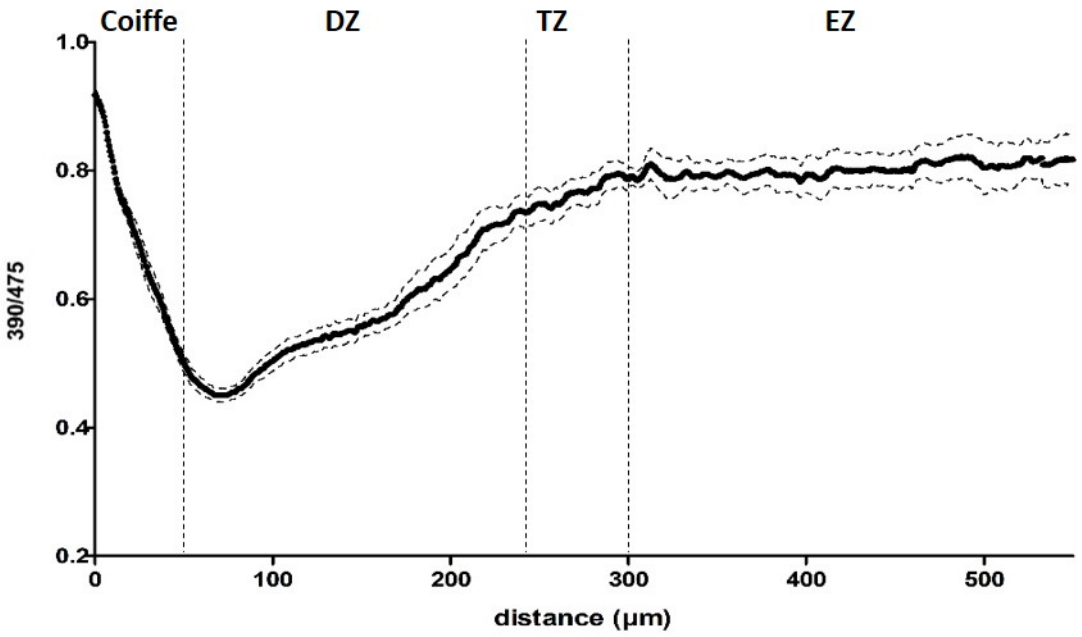


Figure III.27 : Profil longitudinal des ratios de fluorescence moyens (390/475) de racines primaires de plantules exprimant la fusion LuPME1-pHluorine. Observation au microscope ratiométrique. n= 5.

Pour obtenir des informations de pH à partir des ratios de fluorescence, des gammes de calibration *in vivo* ont été réalisées à partir de racines d'Arabidopsis comme décrit dans la section VI.4 du matériel et méthode. Brièvement, les ratios sont collectés sur une plantule soumise successivement à du milieu tamponné à différents pH (Figure III.28 A). Une fois stabilisé, le ratio est collecté pour générer une gamme étalon zone par zone comme illustré avec la gamme réalisée dans la ZT d'une plantule exprimant la fusion AT5G11420 (Figure III 28 B).

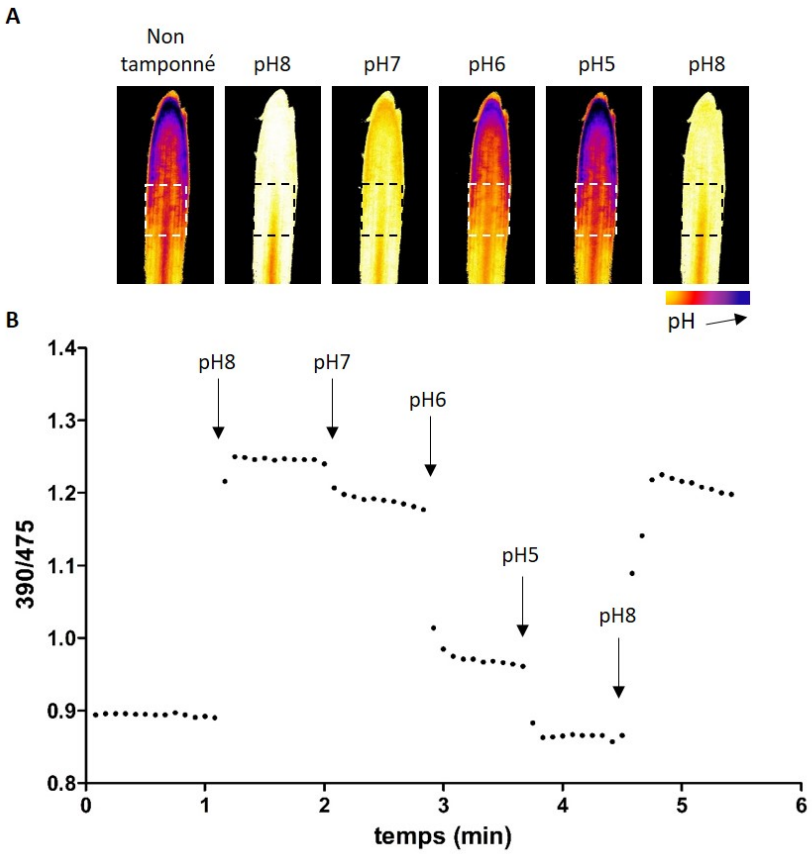


Figure III.28 : Calibration *in vivo* d'une plantule exprimant la fusion AT5G11420-pHluorine réalisée au microscope ratiométrique. A) Du milieu MS/2 tamponné à différent pH est injecté dans la chambre d'observation des plantules qui réagissent immédiatement et réversiblement. La zone de transition est encadrée. B) Les ratios de fluorescence (390/475) sont extraits de la zone de la transition.

Les gammes de calibration *in vivo* ont été réalisées à partir des ratios de fluorescences obtenus dans la DZ, TZ et début d'EZ dans des racines exprimant la LuPME1m-pHluorine (Figure III.27 A) et l'AT5G11420-pHluorine (Figure III.27 B). Les gammes obtenues dans les trois zones de racines exprimant la LuPME1mutée-pHluorine présentent des amplitudes et des pKa qui différent légèrement (6,16-6,5) (Figure III.29 A). La même tendance est observée avec pour les gammes réalisées avec des racines exprimant l'AT5G11420-pHluorine qui ont des différences d'amplitude un peu plus marquées et des pKa compris entre 6,05 et 6,58. (Figure III.29 B). Dans les deux cas, la gamme possédant l'amplitude la plus faible est celle réalisée dans l'EZ. Si l'on compare les gammes des deux fusions pariétales dans la TZ on peut conclure qu'elles sont très proches et que la calibration semble similaire qu'importe la protéine fusionnée à la pHluorine (Figure III.29 C). Des résultats similaires sont obtenus dans la DZ alors qu'une importante différence d'amplitude est présente dans l'EZ.

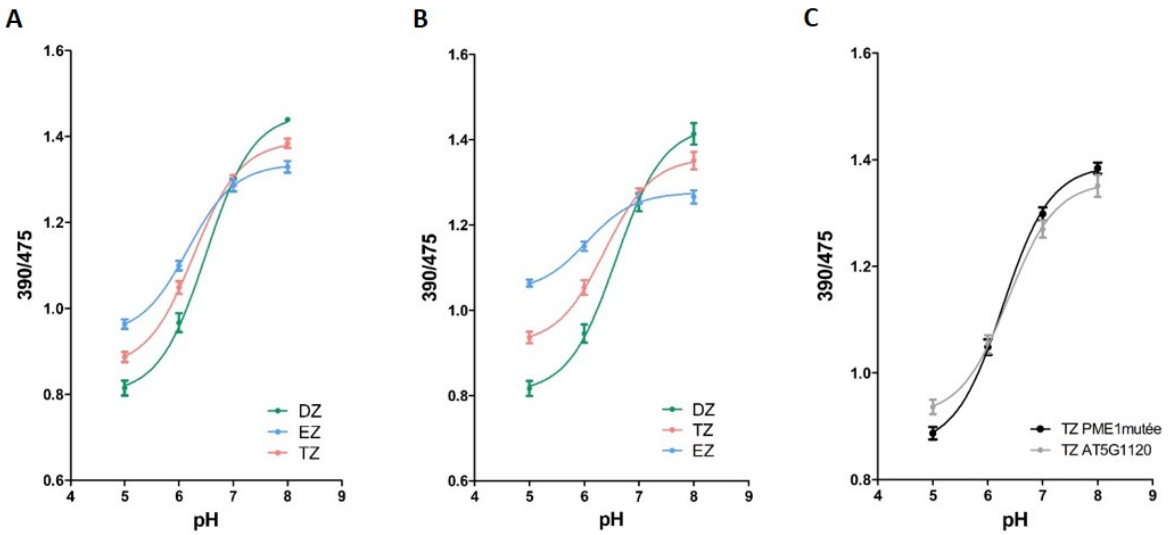


Figure III.29 : Gammes de calibration *in vivo* obtenues à partir des ratios de fluorescence (390/475) dans les zones DZ, TZ et EZ des fusions pariétales LuPME1mutée-pHluorine et AT5G11420-pHluorine. A) Gammes réalisées dans des racines exprimant la LuPME1mutée-pHluorine. B) Gammes réalisées dans des racines exprimant la AT5G11420-pHluorine. C) comparaison des gammes obtenues dans la TZ de racines exprimant la LuPME1mutée-pHluorine ou la AT5G11420-pHluorine.n=3.

De la même façon, des gammes de calibration ont été réalisées avec des racines exprimant la LuPME1-pHluorine dans la DZ et l'EZ. La TZ n'a pas été analysée du fait qu'elle comporte très peu de cellules et qu'elle est plus difficile à définir. Les pKa varient de 6,16 à 6,81 et comme pour les autres fusions pariétales, l'amplitude de la gamme est écrasée dans l'EZ. (Figure III.28 B). Si l'on compare les gammes obtenues avec les trois senseurs de pH pariétaux, on remarque que dans la DZ, la gamme obtenue avec la LuPME1-pHluorine est décalée vers le bas contrairement aux deux autres (Figure III.28 C).

Les variations d'amplitudes des gammes entre les différentes régions et la variabilité d'amplitudes des gammes obtenues dans l'EZ suggèrent qu'il existe un environnement spécifique à chaque zone étudiée qui impacte la capacité à imposer un pH. Ces données montrent également que cette capacité à imposer un pH est modifiée dans le cas de la fusion LuPME1.

Ainsi, il est préférable d'utiliser la gamme réalisée dans la région que l'on souhaite analyser et avec la même fusion pariétale.

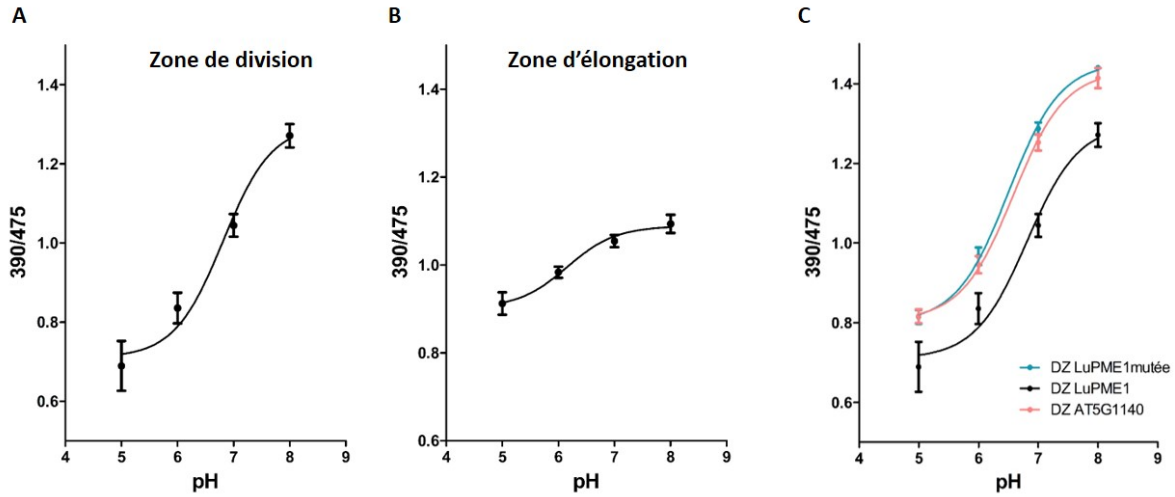


Figure III.30 : Gammes de calibration *in vivo* obtenues à partir des ratios de fluorescence (390/475) de racines primaires d'Arabidopsis exprimant le senseur de pH LuPME1-pHluorine. A) Gamme réalisée dans la zone de division. B) Gamme réalisée dans la zone d'élongation. C) Comparaison des gammes obtenues dans la zone de division avec les fusions LuPME1/ LuPME1mutée/ AT5G11420-pHluorine.n=3.

Si l'on utilise les gammes *in vivo* pour obtenir des valeurs de pH à partir des ratios de fluorescence mesurés, on constate que les ratios mesurés avec les trois senseurs de pH sont quasiment tous hors de la gamme et inférieures au ratio correspondant à pH5. Seule la fusion AT5G11420-pHluorine pourrait apporter des informations de pH car les ratios mesurés se situent à l'extrémité basse de la gamme. Dans le bas de la gamme à proximité du plateau, l'obtention de valeurs de pH est peu précise, néanmoins, on peut estimer le pH moyen dans cette zone à 5,01. Le pH associé aux fusions LuPME1mutée et LuPME1 est inférieur à pH 5. Finalement, la calibration *in vivo* n'a pas permis d'obtenir des valeurs de pH dans la paroi avec la pHluorine. Les ratios de fluorescence se situent juste en dessous du point de pH le plus bas de la gamme : pH5 et les environnements de pH dans lesquels sont localisées les fusions AT5G11420-pHluorine, LuPME1mutée-pHluorine et LuPME1-pHluorine semblent trop acides pour que la pHluorine soit un outil adapté pour obtenir des valeurs de pH dans la paroi dans la racine d'Arabidopsis. Par ailleurs, l'expression de la fusion LuPME1 semble modifier à la fois l'environnement de pH et la capacité du système à s'équilibrer à un pH imposé.

VI. Outils pour explorer le pH de la paroi en relation avec la méthylation des pectines

La LuPME1 dont la fonction est de déméthyler les pectines a été exprimée en épiderme de tabac et en Arabidopsis. Dans le tabac et dans la coiffe et la zone de division de la racine d'Arabidopsis, les ratios de fluorescence associés à la LuPME1 sont systématiquement plus faibles que ceux observés avec la forme mutée, ce qui suggère un environnement plus acide. De plus, on observe au niveau de la zone d'élongation ou dans les poils racinaires que l'allongement des cellules se fait de manière plus rapide (voir Figure III.15 et III.21) Ces observations suggèrent un possible lien entre degré de méthylation des pectines, élongation cellulaire et pH. Dans le but de répondre à cette hypothèse, différentes stratégies complémentaires ont été sélectionnées : 1) Obtenir de lignées d'Arabidopsis impactées dans l'état de méthylation des pectines et qui expriment les senseurs de pH, 2) Moduler l'activité des PMEs chimiquement et observer l'effet sur le pH de la paroi et 3) Se concentrer sur le poil racinaire, modèle de croissance cellulaire qui a déjà permis de faire le lien entre la croissance l'état de méthylation des pectines (Schoenaers et al., 2018).

1. Caractérisation des lignées présentant un degré de méthylation des pectines altéré

Afin d'aller plus loin dans la compréhension des mécanismes qui lient l'activité des PMEs à la régulation du pH apoplasmique, différentes lignées mutantes et une lignée surexpresseur ont été sélectionnées et croisées avec les senseurs de pH (tableau III.2). On retrouve la lignée KO pour le gène de la PME17 fortement exprimé dans les poils racinaires, et qui présente une baisse de l'activité PME en racine de 20% (Sénéchal et al., 2014). La lignée sur-expresseur de la méthyltransférase CGR2 (cotton Golgi Related 2) montre un taux de méthylestérification augmenté (Kim et al., 2015). Pour compléter les données sur la croissance et le pH de la paroi, la lignée aha2.4 affectée dans l'expression de l'H^+-ATPase membranaire AHA2 et dans la sécrétion des protons a aussi été sélectionnée (Haruta et al., 2010)

L'état des lieux des plantes dont nous disposons actuellement sont indiqués dans le tableau III.2. Les plantes exprimant les senseurs de pH dans le fond sauvage sont indiquées dans la colonne Col8. Les promoteurs contrôlant l'expression des senseurs de pH sont détaillés. Comme détaillé dans la discussion du chapitre 2, le promoteur EXPA7 a été utilisé pour

générer des lignées exprimant du signal uniquement dans les trichoblastes. Contrairement à la forme PM-Apo, les fusions pariétales sous contrôle de ce promoteur présentent un signal exploitable. La couleur orange indique les lignées génotypées et homozygotes. En italique, les lignées pour lesquelles le signal de fluorescence est inexploitables.

<table>
<tr><th></th><th>Senseur pH</th><th>Col8</th><th>aha2.4</th><th>pme17-1</th><th>CGR2OX</th></tr>
<tr><td rowspan="3">PM-Apo</td><td>pHluorine</td><td>35S et EXPA7</td><td>35S</td><td>35S</td><td>35S</td></tr>
<tr><td>Acidine2</td><td>UBQ10 ou EXPA7</td><td>UBQ10</td><td>UBQ10</td><td></td></tr>
<tr><td rowspan="3">Acidine4</td><td>UBQ10</td><td rowspan="3">UBQ10</td><td rowspan="3">UBQ10</td><td rowspan="3"></td></tr>
<tr><td>35S</td></tr>
<tr><td>EXPA7</td></tr>
<tr><td rowspan="9">Apo</td><td rowspan="3">pHluorine</td><td>UBQ10</td><td rowspan="3"></td><td rowspan="3"></td><td rowspan="3"></td></tr>
<tr><td>35S</td></tr>
<tr><td>EXPA7</td></tr>
<tr><td rowspan="3">Acidine2</td><td>UBQ10</td><td rowspan="3"></td><td rowspan="3">35S</td><td rowspan="3"></td></tr>
<tr><td>35S</td></tr>
<tr><td>EXPA7</td></tr>
<tr><td rowspan="3">Acidine4</td><td>UBQ10</td><td rowspan="3"></td><td rowspan="3"></td><td rowspan="3"></td></tr>
<tr><td>35S</td></tr>
<tr><td>EXPA7</td></tr>
<tr><td rowspan="9">LuPME1mutée</td><td rowspan="3">pHluorine</td><td>UBQ10</td><td rowspan="3">35S</td><td rowspan="3">35S</td><td rowspan="3"></td></tr>
<tr><td>35S</td></tr>
<tr><td>EXPA7</td></tr>
<tr><td rowspan="3">Acidine2</td><td>UBQ10</td><td rowspan="3">UBQ10</td><td rowspan="3"></td><td rowspan="3"></td></tr>
<tr><td>35S</td></tr>
<tr><td>EXPA7</td></tr>
<tr><td rowspan="3">Acidine4</td><td>UBQ10</td><td rowspan="3"></td><td rowspan="3"></td><td rowspan="3"></td></tr>
<tr><td>35S</td></tr>
<tr><td>EXPA7</td></tr>
</table>

Tableau III.2 : Liste des plantes sauvages (Col8) et lignées de mutants et surexpresseur exprimant la pHluorine ou les Acidine 2 et 4 dans les différents sous domaines de l'apoplasme : PM-Apo, Apo et LuPME1mutée. En italique, les plantes fluorescentes ont été obtenues mais présentent un défaut de fluorescence. En orange sont indiquées les lignées génotypées homozygotes.

Afin de caractériser les lignées, un phénotypage des poils racinaires des lignées mutantes aha2.4 et pme17-1 exprimant le senseur de pH pariétale LuPME1mutée-pHluorine a été initié. Le mutant aha2.4 exprimant la LuPME1m-pHluorine ne présente pas de phénotype particulier au niveau des poils racinaires qui sont similaires à ceux des contrôles col8 (WT) et LuPME1mutée-pHluorine en fond sauvage. En revanche, un phénotype intéressant est observé au niveau des poils racinaires du mutant pme17-1 qui sont peu nombreux, très courts et éparses. L'initiation des poils ne semble pas affectée mais leur élongation est fortement perturbée. Un phénotype un peu moins marqué est observé chez les lignées pme17-1 exprimant la LuPME1mutée-pHluorine. Dans ces lignées, certaines plantes ont très peu de poils allongés alors que d'autres en ont mais dans une moindre mesure comparée aux contrôles (Figure III.31). Ces résultats suggèrent que la modification de l'état de méthylestérification des HGs induite par la perte d'activité de la PME17 a une incidence sur l'élongation des poils racinaires. Le fait que le phénotype soit atténué dans les lignées surexprimant la LuPME1mutée-pHluorine est surprenant car il suggère une possible complémentation et interroge sur l'impact de la surexpression de cette forme a priori inactive *in planta*.

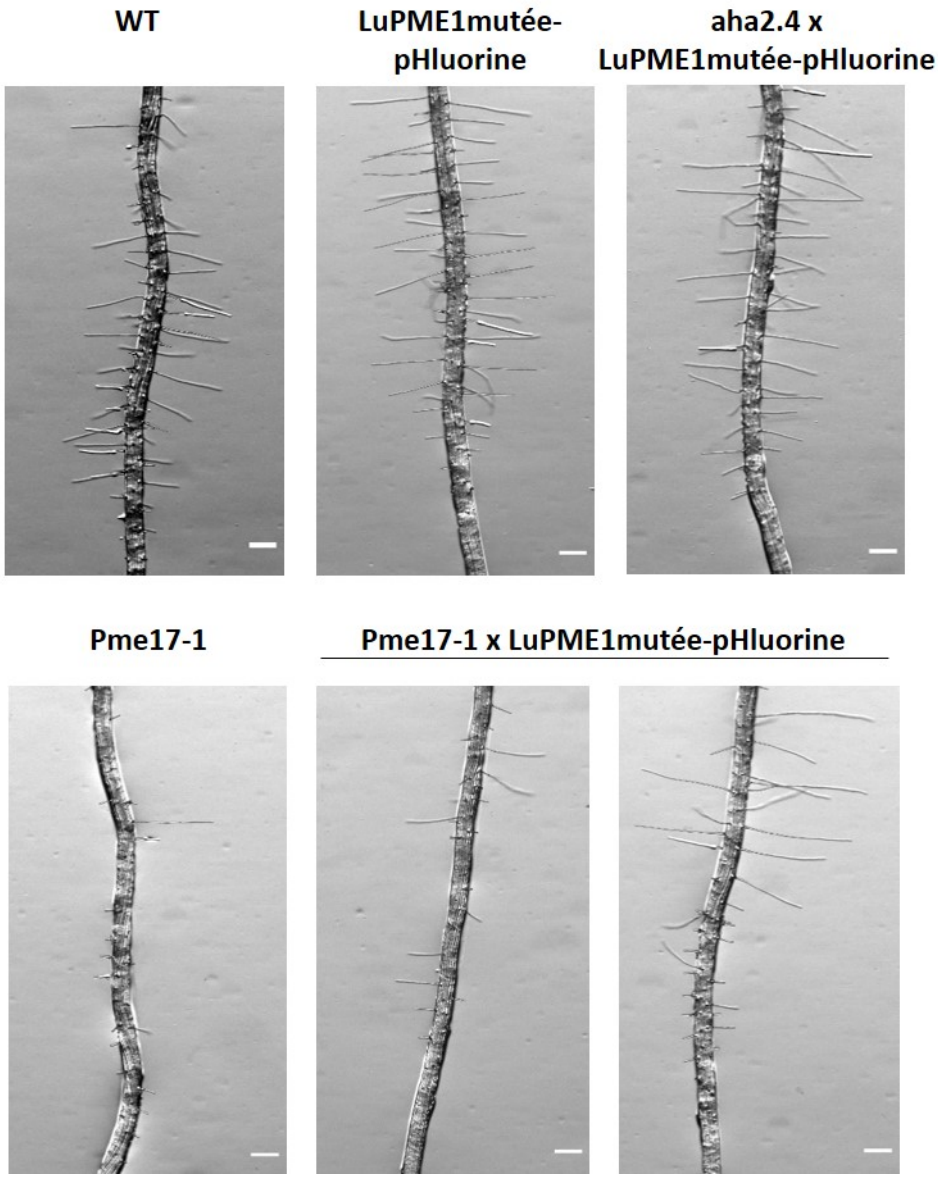


Figure III.31 : Phénotypage des poils racinaires des lignées contrôle sauvage (WT) et LuPME1mutée-pHluorine, du mutant pme17-1 et des mutants aha2.4 et pme17-1 exprimant la LuPME1mutée-pHluorine de 6j ayant poussé sur un milieu MS sans vitamines, 1% saccharose, MES pH5,8 et phytagel 0,8%. Barre d'échelle = 200µm.

Les patrons de fluorescence de ces lignées ont été étudiés et un marquage similaire à celui retrouvé dans le fond sauvage exprimant la LuPME1mutée-pHluorine est présent. De plus, du signal fluorescent est retrouvé dans les poils racinaires comme illustré avec une lignée pme17-1 exprimant la LuPME1m-pHluorine (Figure III.32). Ces lignées ont été obtenues récemment et sont donc en cours de caractérisation et les lignées KO et surexpresseur exprimant l'Acidine4 sont en cours d'amplification. Néanmoins, elles offrent la perspective d'étudier

plus finement les variations de pH pariétal en relation avec une perturbation de la croissance chez des plantes ayant un degré de méthylestérification des HGs modifiés.

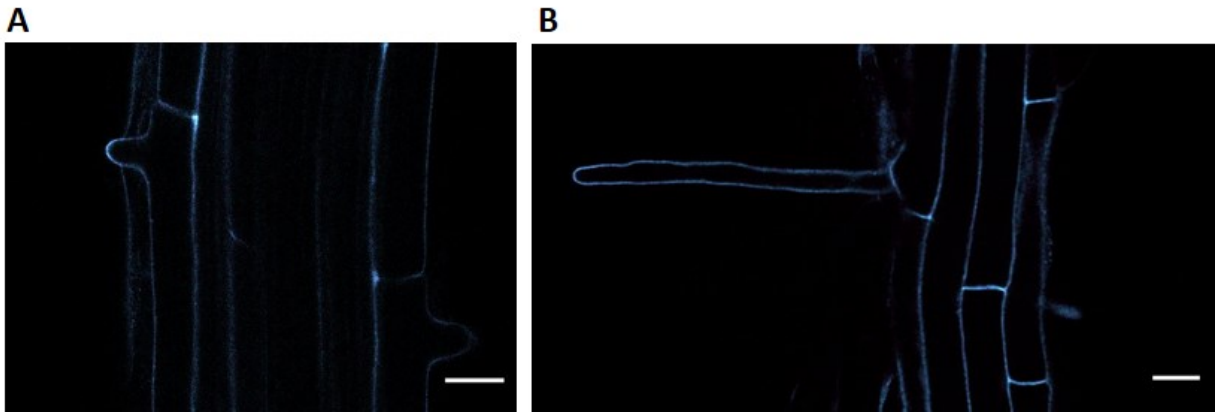


Figure III.32 : Observation au microscope confocal du marquage fluorescent observé dans les poils racinaires de plantules pme17-1 exprimant la fusion LuPME1mutée-pHluorine sous contrôle du promoteur *EXPA7*. A) Poil émergeant. B) Poil en élongation. Echelle = 20µm.

2. Inhibition chimique de l'activité des PMEs

Récemment, l'impact direct de la modification de l'activité des PMEs sur le pH de la paroi a été mis en lumière. En effet, l'inhibition de l'activité des PME par l'epigallocatechine gallate (EGCG), une molécule chimique conduit à une alcalinisation du pH de l'apoplasme de la racine de la racine d'Arabidopsis (thèse de Fan Xu). Il nous a semblé intéressant de reproduire ce résultat pour confirmer l'effet de l'EGCG sur le pH de la paroi. Ainsi, des racines exprimant la fusion LuPME1mutée-pHluorine ont été traitées avec de l'EGCG 200µM et l'évolution des ratios de fluorescence (390/475) a été suivie pendant 15min. L'effet de l'EGCG est immédiat et conduit à une augmentation progressive des ratios de fluorescence au cours du temps comme illustré dans la ZT (Figure III.33). Une augmentation des ratios de fluorescence est observée dans la DZ, TZ et EZ dans des proportions variables (Figure III.33 B). L'effet le plus massif est enregistré dans l'EZ avec une augmentation des ratios de fluorescence de plus de 24% suivi par la TZ avec une augmentation de 20,5% et de la DZ avec 16,5% (Figure III.33 B). Finalement, ces résultats traduisent une augmentation immédiate du pH de la paroi en réponse à l'inhibition de l'activité des PMEs et l'ampleur de la réponse semble dépendante de la région de la pointe racinaire étudiée. Ces données confirment que l'activité des PMEs impactent le pH de la paroi.

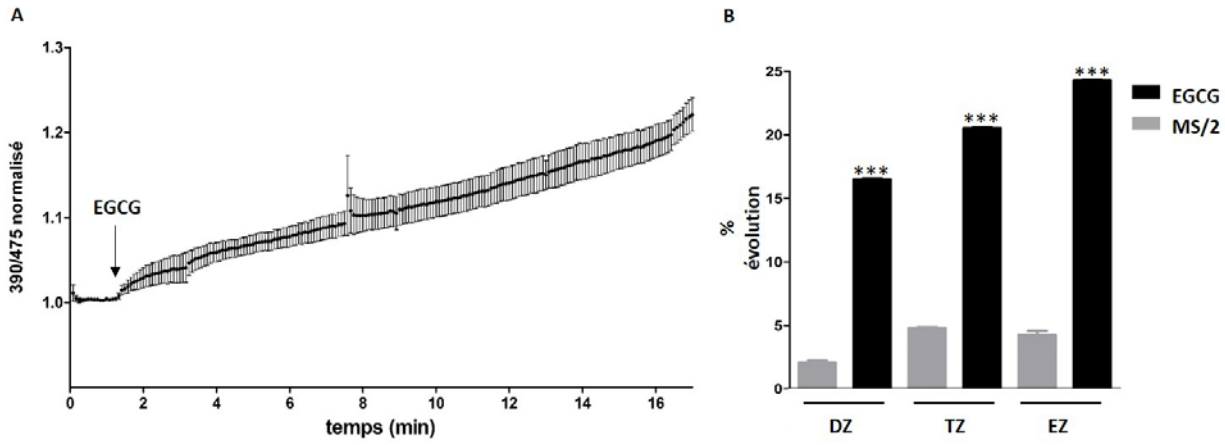


Figure III.33 : Effet de l'EGCG 200µM sur le pH de la paroi de la zone de transition de plantules d'Arabidopsis de 5j. A) Augmentation progressive des ratios de fluorescence (390/475) en réponse à l'EGCG dans la zone de transition. n=3 B) Augmentation des ratios de fluorescence (390/475) dans la DZ, la TZ et l'EZ (noir EGCG, gris MS/2) au bout de 15min. 5<n<10, test de Tukey avec p<0,001.

3. Variations de pH dans le poil racinaire

Le poil racinaire est un modèle cellulaire pour la croissance polarisée et les variations de pH au cours de son développement ont déjà fait l'objet d'études (Bibikova et al., 1998 ; Monshausen et al., 2007). Des observations préliminaires ont été effectuées sur des poils exprimant la fusion LuPME1mutée-Acidine4. Sur la figure III.34 A et B, on peut observer une importante hétérogénéité de ratios de fluorescence le long d'un poil émergent avec des ratios plus faibles au niveau de la pointe du poil (indiqué par une flèche). Cette distribution des ratios de fluorescence suggère un pH plus acide à l'extrémité du poil. Cependant, on ne retrouve pas de variations de ratios de fluorescence dans les poils exprimant la LuPME1mutée-pHluorine renforçant l'idée que l'Acidine4 est plus adaptée à l'environnement de pH de la paroi (Figure III.34 C et D). L'étude de poils racinaires exprimant l'Acidine4 est adaptée pour observer des variations de pH dans la paroi à l'échelle cellulaire.

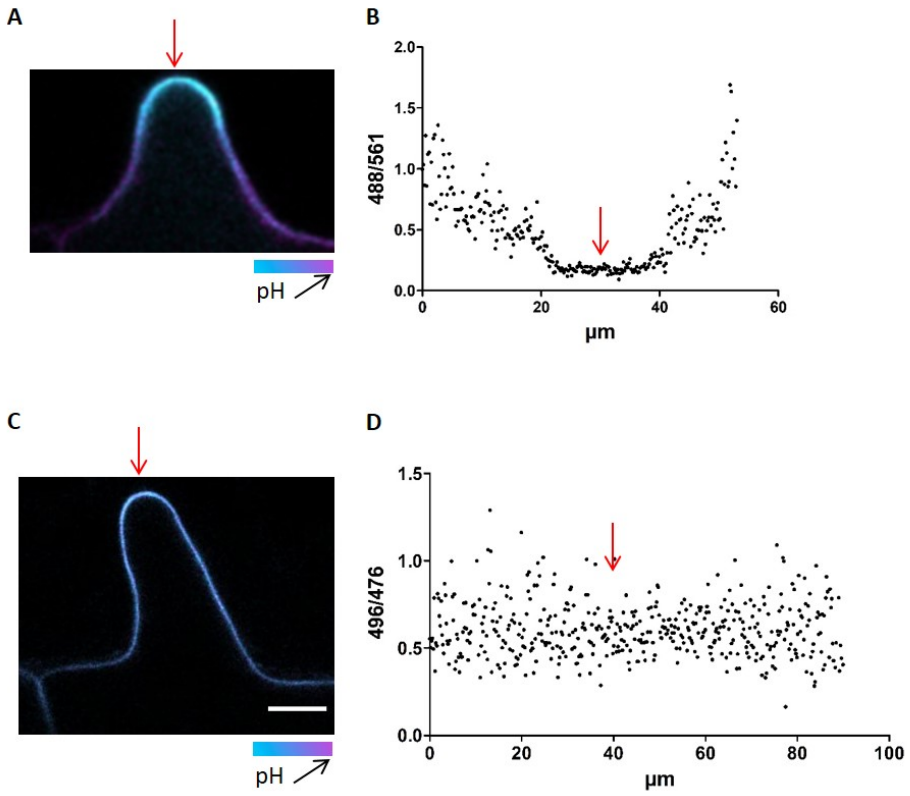


Figure III.34 : Observation au confocal d'un poil racinaire émergeant exprimant la fusion LuPME1mutée-Acidine4 (A et B) ou la LuPME1mutée-pHluorine (C et D). A) Marquage fluorescent obtenu avec la LuPME1mutée-Acidine4, le cyan fluorescence à 561nm et le magenta à 488nm. Plus la couleur cyan domine plus le ratio de fluorescence 488/561 est faible et le pH est acide. B) Variation des ratios de fluorescence 488/561 le long du poil. La pointe du poil est indiquée par une flèche rouge. C) Marquage fluorescent obtenu avec la LuPME1mutée-pHluorine, le cyan fluorescence à 476nm et le magenta à 496m. D) Distribution des ratios de fluorescence 496/476 le long du poil. La pointe du poil est indiquée par une flèche rouge.

Conclusion et discussion

Ce chapitre aborde une partie de mon travail de thèse qui consistait en la production et la caractérisation de senseurs de pH pariétaux permettant d'élargir les domaines de l'apoplasme qui sont ciblés avec les formes PM-Apo et Apo. Trois fusions pariétales ont été générées, deux sont basées sur la protéine de Lin LuPME1 avec une version mutée et non mutée et une dernière est basée sur une protéine pariétale de fonction inconnue AT5G11420. Ces fusions ont été exprimées transitoirement en épiderme de tabac et stablement en Arabidopsis dans des fonds sauvage, mutants (aha2.4 et pme17-1) et surexpresseur : CGR2OX. La localisation de

ces nouveaux senseurs de pH pariétaux et leur capacité à donner des informations de pH dans la paroi sont discutées dans cette partie. De plus, la fonction des protéines utilisées dans les fusions pariétales est également abordée. Finalement, le lien entre degré de méthylestérification des HGs et pH est aussi discuté.

1. Localisation des fusions pariétales

En tabac, les fusions pariétales entre les protéines AT5G11420, LuPME1mutée et LuPME1 et la pHluorine sont retrouvées en contour des cellules et au niveau des jonctions intercellulaires. Des expériences de plasmolyse ont permis de valider la localisation de ces fusions pariétales dans la paroi. Pour aller plus loin, des lignées transgéniques d'Arabidopsis exprimant les fusions pariétales ont été générées. Ces lignées présentent de la fluorescence dans tous les organes pour les fusions avec la LuPME1mutée et seulement dans la racine et les poils racinaires pour la fusion AT5G11420. Aussi, le type de marquage semble différent avec un marquage homogène en périphérie des cellules pour l'AT5G11420 alors que celui des fusions basées sur la LuPME1est présent en contour des cellules et sous formes de points de forte intensité de fluorescence aux coins des cellules. Dans la coiffe, le marquage au COS[647], qui a une forte affinité pour les HGs fortement déméthylés, révèle une forte colocalisation avec le marquage de la fusions AT5G11420 au contraire de la LuPME1mutée qui est faiblement présente dans cette zone. Ainsi, il semblerait que les fusions pariétales soient localisées dans la paroi pectinique avec un taux de HGs déméthylées variable.

Enfin, si l'on compare les marquages obtenus dans la ZT de racines d'Arabidopsis, on peut observer une différence de répartition du signal fluorescent entre les formes PM-Apo, Apo et LuPME1mutée. Ainsi, les fusions pariétales remplissent l'objectif d'élargir les territoires de l'apoplasme explorés jusqu'alors avec les formes Apo et PM-Apo. Les fusions pariétales semblant être associées à la paroi pectinique, il serait intéressant de cibler d'autres composant de la paroi comme la cellulose afin d'élargir la localisation des senseurs de pH pariétaux.

Parmi les perspectives envisagées, on peut aussi étudier la mobilité des fusions pariétales exprimées en Arabidopsis. En faisant du FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) on pourrait déterminer si les fusions pariétales sont amenées à se décrocher de la paroi et sont mobiles.

2. Mesure du pH dans la paroi avec les fusions pariétales pHluorine

L'expression des fusions pariétales a permis de détecter des différences de ratio de fluorescence en épiderme de tabac et dans la pointe racinaire. En effet, dans les cellules de la coiffe, une différence significative est retrouvée entre les fusions AT5G11420 et LuPME1mutée alors qu'en épiderme de tabac, les ratios mesurés avec ces deux fusions sont similaires. En épiderme de tabac, les ratios mesurés avec les fusions pariétales présentent des valeurs inférieures à ceux mesurés avec la PM-Apo suggérant un environnement de pH plus acide dans la paroi. Enfin, dans la pointe racinaire (coiffe et zone méristématique), les ratios mesurés avec la LuPME1-pHluorine sont très inférieurs à ceux mesurés avec la LuPME1mutée-pHluorine. Aussi, les écarts de ratios de fluorescence mesurés avec les différentes fusions pariétales suggèrent l'existence de sous-domaines de pH dans la paroi pectinique. Cependant, il reste à déterminer si ces différences de pH s'expliquent par une localisation différente des senseurs de pH pariétaux, par une éventuelle compétition avec les protéines endogènes ou si elles sont liées à une possible activité des protéines pariétales utilisées pour générer ces fusions.

Des gammes de calibrations *in vivo* ont été réalisées afin d'obtenir des valeurs de pH à partir des ratios de fluorescences enregistrés avec les fusions pariétales. Ces gammes ont été réalisées avec des tampons de pH allant de pH5 à pH8 et en récoltant les variations de ratios de fluorescence en réponse aux changements de pH dans des racines d'Arabidopsis. Les données obtenues font échos à ce qui est décrit dans le chapitre 2, à savoir que les gammes présentent des amplitudes différentes selon la zone de la racine étudiée. Ces données confirment que pour que les informations de pH soient les plus rigoureuses possibles, il faut se référer à la gamme réalisée dans la zone d'intérêt. De façon surprenante, les gammes obtenues avec les fusions AT5G11420 et LuPME1mutée se superposent alors que celles obtenues avec la fusion LuPME1 semblent avoir un pKa et une amplitude différente. Ces informations suggèrent que la capacité à imposer le pH est différente dans les plantes exprimant la version non mutée de la LuPME1.

Finalement, les ratios de fluorescence mesurés avec les différents senseurs de pH pariétaux se situent tout en bas des gammes de pH *in vivo* et même en dessous. Les environnements de pH associés à ces senseurs de pH pariétaux sont trop acides pour être étudiés avec des fusions basées sur la pHluorine. En effet, dans la racine d'Arabidopsis, seule

la fusion AT5G11420 a permis de mesurer des ratios de fluorescence tout en bas de la gamme et se situant aux alentours de pH5. Les ratios de fluorescences mesurés avec l'AT5G11420 dans la racine d'Arabidopsis étant plus élevés que ceux mesurés avec les fusions LuPME1, on s'attend à un environnement de pH plus acide que celui retrouvé à proximité de la membrane plasmique (PM-Apo) qui varie entre 5,8 et 4,5. Pour résoudre ce problème, des fusions pariétales avec les Acidines 2 et 4 ont été générées. L'Acidine4 semble être le senseur adapté à l'environnement de pH de la paroi. En effet, selon les données publiées, la paroi des cellules de la pointe racinaire a déjà été mesuré avec l'Oregon Green fusionné à un domaine de liaison à la cellulose (Fasano et al., 2001) et varie entre 4,8 et 6. Malheureusement, à ce jour, les plantes exprimant la fusion LuPME1mutée-Acidine4 présentent un défaut de fluorescence (signal intracellulaire). Une nouvelle transformation a été réalisée et les graines obtenues seront prochainement criblées. Pour la LuPME1 qui semble associée à un environnement plus acide, il se peut qu'on se retrouve dans la limite basse de l'Acidine4 et il faudrait aussi générer une fusion LuPME1-Acidine2. En conclusion, l'expression de fusions pariétales avec l'Acidine 2 et 4 en épiderme de tabac serait certainement plus informative et pourrait permettre d'obtenir des informations plus pointues sur le gradient de pH de l'apoplasme.

3. Activité des protéines pariétales pour générer les senseurs de pH pariétaux

Dans le cas de la fusion avec la LuPME1 non mutée, plusieurs données convergent vers l'idée que cette protéine pourrait être fonctionnelle en Arabidopsis. En effet, l'expression stable de la LuPME1-pHluorine génère un important phénotype au niveau de la pointe racinaire avec une désorganisation des différentes zones et des cellules qui entrent en élongation rapide très tôt. Ce type de phénotype est présent dans toutes les lignées LuPME1-pHluorine mais n'est retrouvé dans aucune autre lignée exprimant l'AT5G11420-pHluorine ou la LuPME1mutée-pHluorine. Dans ce contexte, le phénotype observé semble lié à la protéine LuPME1 et probablement pas au site d'insertion du transgène codant pour ce senseur de pH. Enfin, l'écart de ratios de fluorescence reflétant l'environnement de pH est systématiquement retrouvé entre les formes LuPME1 et LuPME1mutée-pHluorine et pourrait s'expliquer par l'activité de la LuPME1. Une fois de plus, cela interroge sur le lien qui existe en degré de méthylestérification des HGs, capacité d'échanges de cations de la paroi et pH.

Afin de déterminer si la fusion LuPME1-pHluorine présente bien une activité lorsqu'elle est exprimée en Arabidopsis, des analyses d'empreintes enzymatiques sont en cours en collaboration avec Samantha Vernhettes.

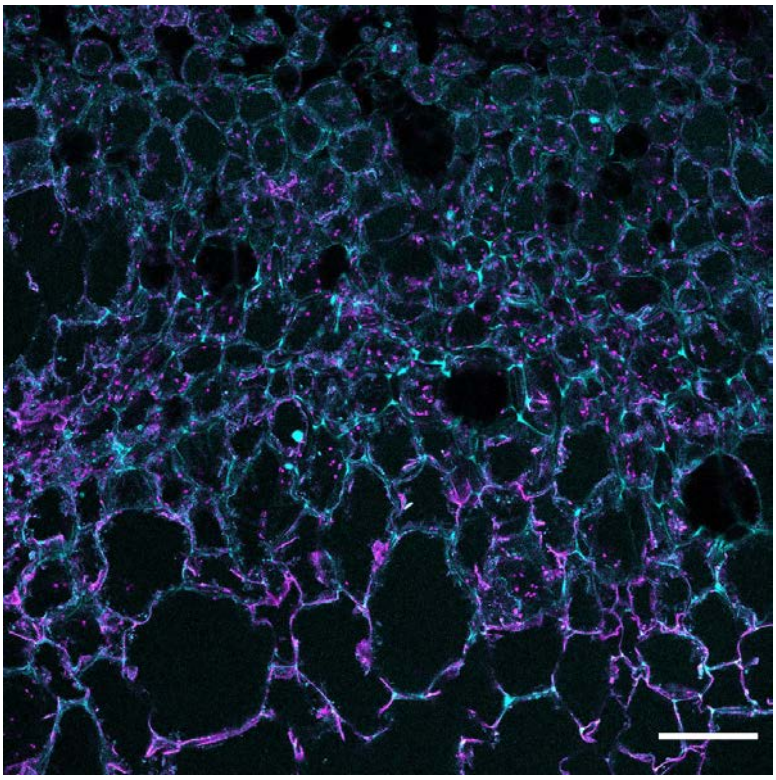
Concernant la protéine pariétale AT5G11420, peu d'informations sont disponibles dans la littérature au sujet de son activité. Des données montrent qu'*in vitro*, AT5G11420 interagit spécifiquement avec le site catalytique d'AtPME3 (At3g14310) et une protéine Leucine-Rich Repeat (LRR) AtFLR1 (At3g12145) relative aux inhibiteurs des polygalacturonases (Zuñiga-Sànchez et Gomboa-de Buen, 2012). De plus, la protéine AT5G11420 possède un domaine de liaison aux carbohydrates qui est retrouvé dans des enzymes bactériennes hydrolysant les pectines et les hémicelluloses (Zuñiga-Sànchez et Gomboa-de Buen, 2012). Ces données suggèrent qu'AT5G11420 pourrait jouer un rôle dans les interactions entre PME et LRR et moduler le degré de méthylestérification des pectines. Il serait intéressant de muter le domaine de liaison aux carbohydrates de l'AT5G11420 et d'étudier s'il y a un impact au niveau de l'état de méthylestérification des pectines et du pH environnant.

4. Lien entre degré de méthylestérification des pectines et pH

Une des questions que je me suis posée pendant ma thèse est de savoir s'il existe un lien entre degré de méthylestérification des HGs et pH de l'apoplasme. On sait que la déméthylation des HGs par les PMEs libèrent des charges négatives qui peuvent interagir avec les protons et on sait également que l'activité des PMEs libère des protons. Le lien direct entre activité des PMEs et pH de l'apoplasme a déjà été exploré grâce à l'utilisation d'un inhibiteur chimique des PMEs : l'EGCG. Les données obtenues avec la fusion LuPME1mutée-pHluorine confirment ce qui a été décrit avec l'ApopHusion par Fan Xu dans son manuscrit de thèse, à savoir que l'inhibition des PMEs entraine une importante alcalinisation du pH de la paroi. De plus, l'effet de l'EGCG est dépendant de la zone étudiée et est maximal dans la zone d'élongation. L'inhibition des PMEs et donc une plus grande proportion d'HGs méthylées conduit à une augmentation du pH environnant. Si l'on considère l'hypothèse d'une activité de la LuPME1 *in planta*, on peut mettre en parallèle une acidification du pH avec potentiellement un degré de méthylestérification des HGs plus faible en raison de l'activité de la LuPME1. Ce qui irait dans le même sens que les données obtenues avec l'EGCG. Néanmoins, ce raisonnement est purement hypothétique et il faut valider en priorité l'effet de la surexpression de la LuPME1 sur le degré de méthylestérification. On peut également se demander si l'effet de l'EGCG serait amplifié dans les plantes exprimant la LuPME1-pHluorine. De plus, l'étude des mutants pme17-1 et CGR2OX permettrait d'approfondir la question.

Finalement, le lien entre degré de méthylestérification et pH associé à la paroi serait à étudier en parallèle de la croissance. Le modèle du poil racinaire est adapté à cette problématique d'autant plus que le mutant pme17-1 est affecté au niveau de l'élongation des poils racinaires alors que nos lignées exprimant la LuPME1 non mutée montrent au contraire des poils plus longs. L'analyse du signal de la LuPME1mutée-Acidine4 dans les poils a révélé un important gradient de pH le long du poil avec une pointe particulièrement acide. Ce senseur de pH semble donc adapté à l'étude des variations de pH en relation avec la croissance. De nombreuses approches ont été déployées dans mon équipe pour maitriser un système de culture d'Arabidopsis permettant à la fois la croissance des poils et l'injection de traitements. Le système de culture de plantules d'Arabidopsis sur puce (Ibidi) a donné des résultats prometteurs et offre la perspective de pouvoir étudier les variations de pH au cours de la croissance du poil.

Chapitre 4 : Cartographie des pH dans la baie de raisin



Marquage pariétal de cellules de la pulpe de raisin Ugny blanc avec de l'iodure de propodium (magenta) et du COS^{488} (cyan). Echelle = 100µm.

Chapitre 4 : Cartographie des pH dans la baie de raisin

Introduction :

La vigne est une espèce fruitière de grand intérêt économique qui produit des fruits charnus, les raisins dont 71% servent à élaborer du vin et 27% et 2% sont respectivement utilisés pour la consommation de fruits frais et secs (Conde et al., 2007).

Au cours de son développement, le raisin accumule eau, sucres, acides organiques, composés phénoliques et précurseurs aromatiques. La composition des raisins à la vendange détermine leur qualité et impacte fortement la qualité des vins produits (Conde et al., 2007). Aussi, le pH du jus de raisin est un élément déterminant dans les processus de vinification et la qualité des vins. En effet un pH supérieur à 3,8, entraine des caractéristiques indésirables comme une couleur foncée, un goût plat, un déséquilibre du rapport sucre/acide conférant aux vins une acidité moins présente et un goût sucré plus marqué ainsi qu'une moins bonne stabilité (Sommers, 1975).

L'acidité dépend de deux paramètres, du pH qui correspond à l'activité des ions hydrogènes libres et de l'acidité titrable qui correspond à la quantité d'ions hydrogènes interagissant faiblement avec les acides et pouvant être relâchés. D'un point de vue chimique, la pulpe d'un fruit peut être considérée comme une solution aqueuse dans laquelle les acides faibles sont partiellement sous forme libre et partiellement associés à des cations monovalents (principalement le potassium) pour former des sels (Lobit et al., 2006). Les deux acides organiques majoritaires sont l'acide tartrique et l'acide malique qui représentent jusqu'à 92% des acides organiques totaux (Conde et al., 2007). La concentration en protons libres résulte donc d'un équilibre complexe entre formes anioniques des acides malique et tartrique, possédant chacun deux fonctions acides, et la présence de cations majoritairement représentés par le K^+ qui est le cation le plus abondant dans les baies et s'accumule tout au long de leur développement (Rogiers et al., 2017). En effet, on retrouve jusqu'à 5mg de K^+ dans la baie (Rogiers et al., 2006) et environ 900mg/L dans les moûts et le vin (Conde et al., 2007). De plus, les variations de pH semblent plus étroitement liées à des variations de concentration de K^+ et de Na^+ qu'à des changements de concentration en acide malique et tartrique. Effectivement, un changement de concentration de 10% des cations K^+ et Na^+ conduit à une augmentation de pH d'approximativement 0,1 unité (Boulton 1980).

Malgré son importance dans la physiologie du raisin, une forte concentration de potassium dans la baie au moment de la récolte a une incidence négative sur la qualité du vin. Effectivement, le K^+ diminue la quantité d'acides libres en interagissant avec et, au-delà d'une certaine concentration, forme des précipités insolubles avec l'acide tartrique (bitartrate de potassium) ce qui réduit l'acidité de la baie (Davies et al., 2006).

Au cours de son développement, le raisin change de taille, de couleur et sa composition évolue avec un pH qui augmente, bien qu'il reste dans une gamme de pH très acide. Au stade vert, le pH du jus de la baie est de 2,5 alors qu'au stade de maturité, le pH de la baie est de 3,5 (Ruffner 1982). Une simple empreinte de baie à différents stades de développement permet d'illustrer le faible pH des raisins et la présence d'une forte hétérogénéité de pH dans les différents tissus de la baie (Figure IV.1). En effet, les régions autour du système vasculaire central et périphérique semblent avoir un pH aux alentours de 5 alors que la pulpe semble être plus acide avec un pH qui fluctue entre 3 et 4 (Figure IV.1).

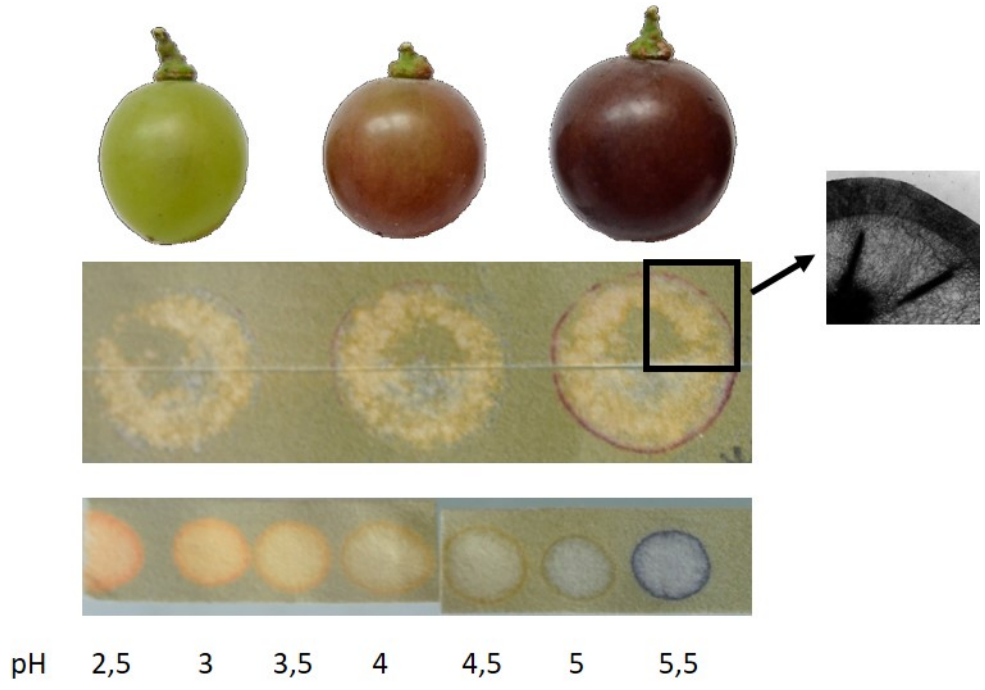


Figure IV.1 : Empreinte de baie de Grenache au stade vert, à véraison et à maturité sur un papier pH.

Les changements morphologiques et biochimiques de la baie sont en lien avec des changements de composition et de morphologie des vacuoles qui évoluent au cours du développement. Les vacuoles sont le réservoir principal des cellules de la pulpe. La vacuole

centrale représente plus de 90% du volume des cellules et accumule sucres, acides organiques, eau, aromes et ions et sa composition impacte directement la qualité finale du fruit (Storey et al., 1987). De par le volume occupé par les vacuoles, le pH du jus de la baie peut être considéré comme représentatif du pH vacuolaire (Terrier et al., 2001). Dans les cellules de la pulpe, il existe une grande diversité de vacuoles en terme de taille et d'acidité (Figure IV.3) (Fontes et al., 2011). Cette différence morphologique est probablement associée à une diversité de fonctions. Ainsi, il a déjà été démontré qu'il peut coexister différents types de vacuoles dans les cellules de plante avec des fonctions soit de stockage soit de dégradation (Paris et al. 1996). Les valeurs extrêmes de pH observées dans la vacuole de cellules de raisin en font un modèle d'intérêt pour l'étude des flux et du stockage des protons et acides organiques.

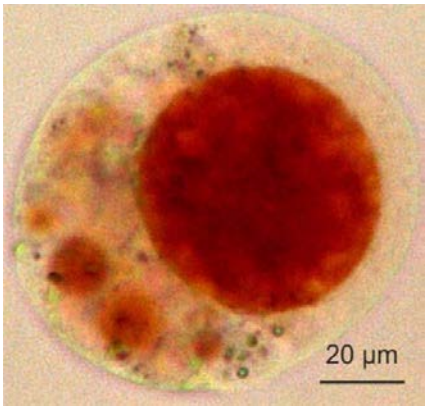


Figure IV.2: Diversité des vacuoles dans un protoplaste de cellule de la pulpe coloré au rouge neutre. Le rouge neutre est un indicateur de pH qui passe librement les membranes cellulaires et précipite dans un environnement acide comme les vacuoles des cellules végétales. Plus l'intensité de coloration est élevée et plus l'environnement est acide. Fontes et al., 2011

Le stade vert est caractérisé par une accumulation des acides organiques, des tannins et des précurseurs des composés phénoliques dans la vacuole (Kuhn et al., 2013). Cependant, ce n'est qu'à partir de la véraison que l'on observe une importante activité des systèmes de transport à la membrane plasmique et au niveau du tonoplaste qui est à l'origine d'une entrée massive de sucres et d'eau dans la vacuole conduisant à la turgescence des cellules avec un rôle crucial dans le développement de la baie de raisin. Les flux d'eau et de nutriments dans la baie font intervenir le xylème et le phloème. Avant véraison, c'est le xylème qui assure le transport d'eau et de nutriments générant la majorité du volume de la baie. Puis, après véraison, on observe une perte de la conductance du xylème et c'est le phloème qui est seul à l'origine des flux d'eau et de solutés. Il y a aussi un passage de la voie symplastique à la voie

apoplastique, ce qui implique que l'import de nutriments et d'eau par le phloème passe à travers plusieurs membranes plasmiques par le biais de canaux et de transporteurs. Le pH apoplasmique participe à la régulation de l'activité des systèmes de transports à la membrane plasmique. Cependant, peu de données sur le pH apolasmique des cellules de la pulpe de raisin sont disponibles. Une étude souligne une évolution différente au cours du développement selon les cépages avec une diminution pendant la maturation de la baie (de pH4,5 à 3,7) pour le merlot alors que pour le Concord, le pH apoplastique augmente de 3,7 à 4,7 durant la maturation (Keller et Shrestha, 2014). Si l'on considère que le pH cytosolique est de 7,5, on observe un fort gradient de H^+ à la membrane plasmique comme au tonoplaste qui est impliqué et nécessaire au transport des solutés tels que les sucres et le potassium du phloème vers les vacuoles des cellules de la pulpe (Keller et Shrestha, 2014).

L'entrée de saccharose et d'hexoses (fructose et glucose) dans le cytosol des cellules de la pulpe est réalisée par différentes familles de transporteurs : les symports saccharoses/ H^+ SUC (Sucrose), les transporteurs de saccharose et d'hexoses indépendants du pH SWEET (Sugars Will Eventually be Exported Transporter) et les antiports hexose/H^+, HT (Hexoses transporter) (Figure IV.3). Au niveau de la membrane plasmique, on retrouve les transporteurs VvSUC11 et 12, VvHT1/4 et 5 et VvSWEET10 qui assurent les flux de sucres dans les cellules de la pulpe pensant la maturation de la baie (Davies et al., 1999 ; Fillon et al., 1999 ; Zhang et al., 2019). Une fois dans le cytoplasme des cellules de la pulpe, les sucres sont pris en charges par des antiports tonoplastiques sucre/H^+ : les HT2 et 6 et TMT1 (Tonoplastic Monosaccharide Transporter 1) (Lecourieux et al., 2014 ; Zeng et al., 2011). Dans la baie, le chargement du K^+ dans les cellules de la pulpe est assuré principalement par trois canaux shaker, deux sortant et un entrant, (Figure IV.3). VvK3.1 et VvK5.1 sont des canaux sortant exprimés à la membrane plasmique des cellules du phloème et permettent un efflux massif de K^+ dans l'apoplasme (Nieves-Cordones et al., 2019, Villette et al., 2019). Le K^+ va ensuite être chargé dans les cellules de la pulpe par VvK1.2, un canal entrant, exprimé à la membrane plasmique des cellules du mésocarpe et dont l'activité assure le maintien du gradient de K^+ permettant le chargement des autres nutriments dans la baie (Cuéllar et al., 2013). L'activité des canaux shaker est fortement régulée par le pH. En effet, à pH5, le courant conduit par VvK5.1 est diminué de 50% comparé à celui enregistré à pH 6 (Villette et al., 2019). De la même façon, l'activité de VvK3.1 est négativement régulée par une chute du pH alors que l'activité de VvK1.2 est positivement régulée (Nieves-Cordones et al., 2019 ; Cuéllar et al., 2013). Une fois dans le cytoplasme des cellules du mésocarpe, le potassium est chargé dans la

vacuole par l'intermédiaire de l'antiport VvNHX1 qui couple le mouvement passif de protons hors de la vacuole à l'incorporation active de cations tels que le potassium et le sodium (Figure IV.3). VvNHX1 est principalement exprimé après véraison et jouerait un rôle primordial dans l'accumulation de potassium dans la vacuole nécessaire à la turgescence et à l'expansion des cellules (Hanana et al., 2007). L'accumulation de K^+ dans la vacuole par l'intermédiaire de VvNHX1 participe également au maintien à l'homéostasie du K^+ (Pardo et al., 2006).

Au cours de la maturité, deux mécanismes convergent pour maintenir l'acidité de la vacuole : l'accumulation des acides organiques dans la vacuole et l'activité des pompes à protons tonoplastiques (Figure IV.3). Deux pompes à protons vacuolaires dont l'activité globale augmente au cours de la maturation ont été caractérisées : la vPPase et la vATPase (Terrier et al., 2011). Ces deux pompes à protons tonoplastiques sont à l'origine d'un gradient électrochimique au travers du tonoplaste (Blumwald 1987).

Peu de données sont disponibles dans la littérature concernant les systèmes de transport qui participent au stockage des acides organiques dans la vacuole (Figure IV.3). VvtDT (tonoplast dicarboxylate transporter), un homologue d'AttDT transporteur de malate tonoplastique a été identifié chez la vigne (Rongala, 2008). De plus, VvALMT9 (aluminium-activated malate transporter), un canal permettant l'influx de malate et de tartrate dans la vacuole des cellules de la pulpe a été identifié et caractérisé et son expression croissante au cours de la maturité suggère son implication pour empêcher la décompartimentation excessive des acides organiques (De Angeli et al., 2013). Le malate entre dans la vacuole sous forme dianionique $malate^{2-}$. Une fois dans la vacuole acide, il est rapidement protoné ce qui participe au maintien du gradient électrochimique permettant l'influx de $malate^{2-}$ (Sweetman et al., 2009). A maturité, l'export de malate dans le cytoplasme participe à l'augmentation du pH vacuolaire. Une fois exporté, le malate va être dégradé par le biais de la respiration mitochondriale (Kanellis et Roubelakis-Angelakis, 1993).

In fine, les flux de nutriments augmentent l'osmolarité de la vacuole et entrainent des flux d'eau qui se font via les aquaporines VvPIP1A, VvPIP2.1 (Plasma membrane Intrinsic Protein) à la membrane plasmique et VvTIP2.1 (Tonoplast Intrinsic Protein) localisée dans le tonoplaste (Picaud et al., 2003 ; Fouquet et al., 2008). Les flux d'eau vont entrainer la turgescence des cellules de la pulpe et, combiné au relâchement pH-dépendant de la paroi, vont permettre l'élongation des cellules. L'augmentation de volume des fruits charnus est le résultat premier de l'accumulation d'eau dans les cellules qui conduit à leur expansion,

facteur principal de la croissance des fruits (Cong et al. 2002). Le rôle de l'expansion cellulaire est également suggéré chez la vigne *Vitis vinifera* dont la variabilité de taille des baies semble principalement liée à des modifications de la taille des cellules plutôt qu'à la division cellulaire (Fernandez et al., 2006).

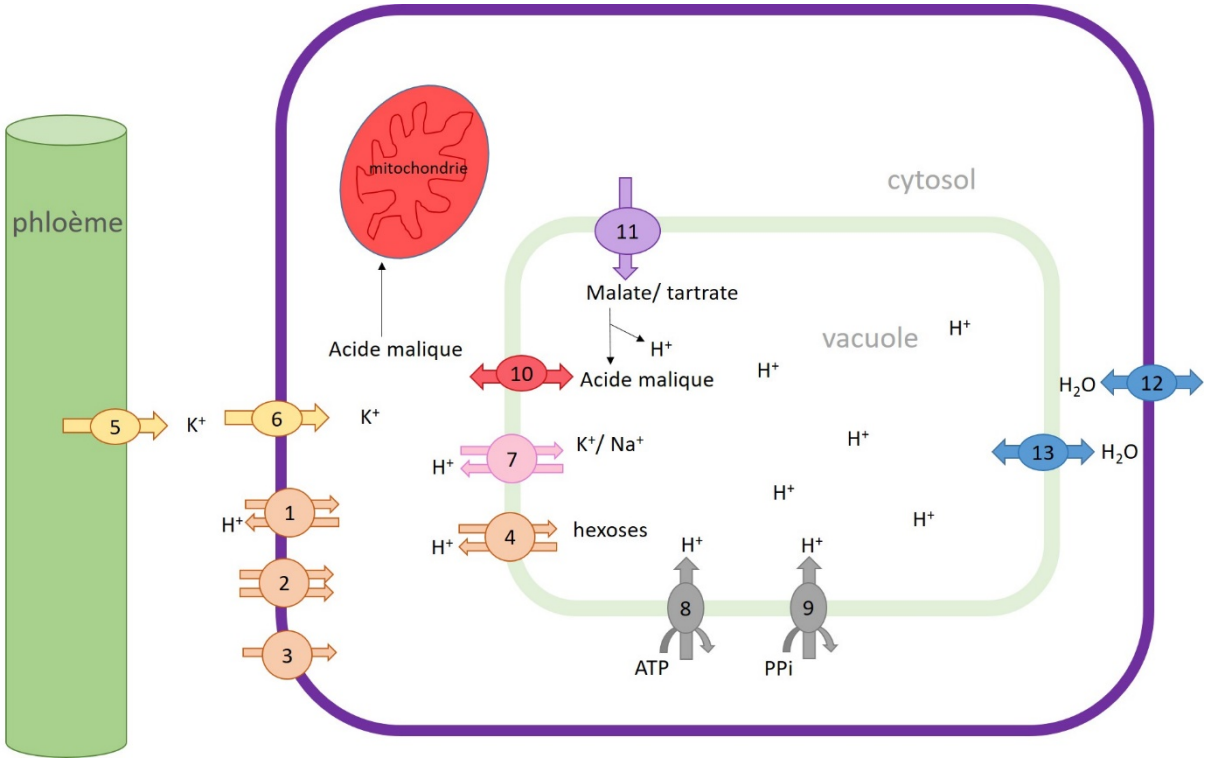


Figure IV. 3: Flux de sucres, de potassium, d'acides organiques et d'eau dans une cellule de la pulpe. (1) VvHT1, 4 et 5 antiport H^+/ hexoses (Fillon et al., 1999 ; Lecourieux et al., 2014) ; (2) VvSUC11 et 12 (Davies et al., 1999); (3) VvSWEET10 (Zhang et al., 2019); (4) VvHT2 et 6 (Fillon et al., 1999 ; Lecourieux et al., 2014) ; (5) VvK3.1 et VvK5.1, canaux shaker potassiques sortant (Nieves Cordones et al., 2019 ; Villette et al., 2019) ; (6) VvK1.2 canal shaker potassique entant (Cuéllar et al., 2013) ; (7) VvNHX1 antiport H^+/Na^+ et H^+/K^+ (Hanana et al., 2007) ; (8) vATPase ; (9) vPPase (Terrier et al., 1998 ; Fontes et al., 2010) ; (10) VvtDT transporteur de malate (Ruffner and Hawker, 1977 ; Rongala 2008) ; (11) VvALMT9 canal perméable au malate et au tartrate (De Angeli et al., 2013) ; (12) Aquaporines VvPIP1A et VvPIP2.1 (Fouquet et al , 2008) ; (13) Aquaporine VvTIP2.1 (Fouquet et al., 2008). D'après Fontes et al., 2011.

Tout au long du développement de la baie, le maintien du pH de la vacuole et l'apoplasme est essentiel pour assurer l'homéostasie des sucres et des acides organiques dans

la baie de raisin et pour maintenir la croissance et le développement des raisins. L'analyse de la distribution des protons à l'échelle cellulaire et subcellulaire permettrait d'améliorer la compréhension des mécanismes de régulation des systèmes de transports contribuant aux flux de potassium, au chargement de la baie et à l'évolution du pH de la baie au cours du développement.

L'objectif de ce chapitre est d'explorer le pH des deux compartiments les plus acides des cellules de la pulpe : l'apoplasme et la vacuole. Le pH de la vacuole est un élément déterminant dans la qualité des raisins. Le pH apoplastique, quant à lui, régule les systèmes de transport membranaire pilotant les flux de nutriments accumulés dans la vacuole. Il est aussi impliqué indirectement dans la croissance cellulaire en permettant la turgescence des cellules et directement via le relâchement de la paroi. Les résultats présentés dans ce chapitre ont été majoritairement obtenus à partir de baies de Grenache, cépage très cultivé dans la région Occitanie et est au cœur des recherches de l'équipe KalipHruit. De plus, la peau des baies de Grenache est épaisse et permet de réaliser de fines sections indispensables à l'observation au microscope. Néanmoins, des baies d'autres cépages comme le Cabernet Sauvignon et l'Ugny blanc ont aussi été utilisées.

Résultats

I. Exploration de l'espace apoplasmique des cellules de la pulpe de baie de raisin

En vue d'étudier le pH de l'apoplasme des cellules de la pulpe, deux stratégies ont été choisies : l'expression de senseur de pH encodés génétiquement et l'utilisation de sondes fluorescentes permettant de mesurer le pH. Par ailleurs, un lien entre composition de la paroi pectinique et pH a été suggéré par la présence de deux membres de la famille des PMEs dans des QTLs liés au pH chez une descendance d'un croisement entre deux cépages contrastés en acidité (Duchêne et al., 2020). C'est pourquoi, des essais ont été réalisés avec une sonde fluorescente spécifique des pectines déméthylées pour obtenir des informations sur la composition de la paroi pectinique.

1. Expression de la fusion PM-Apo + 1,5 pHluorine pour réaliser des mesures de pH apoplasmique

Afin d'obtenir des données de pH apoplasmique à proximité de la membrane plasmique, des baies de Grenache ont été agro-infiltrées avec la fusion PM-Apo+1,5-pHluorine, une variante de la PM-Apo-pHluorine sans effet sur la mesure des pH (Martinière

et al., 2018). A partir de 10 jours post transformation, les baies sont coupées en fines sections de 150µm et montées entre lame et lamelle dans une solution de saccharose + $CaCl_2$ 100µM et KCl 5mM pour observation au microscope à épifluorescence puis confocal. On peut observer que très peu de cellules sont transformées et que les cellules qui fluorescent présentent un signal réticulé en périphérie et autour du noyau (Figure IV.4). Ce signal est caractéristique d'une localisation dans le réticulum endoplasmique et signifie que la fusion PM-Apo pHluorine est bloquée dans le système de sécrétion et n'atteint pas sa destination finale : la membrane plasmique. De plus de l'autofluorescence est visible en contour des cellules et est indiquée par une flèche blanche (Figure IV.4). La mauvaise localisation de la PM-Apo pHluorine ne permet pas de réaliser des mesures de pH apoplasmique dans les cellules de la pulpe de baie de Grenache.

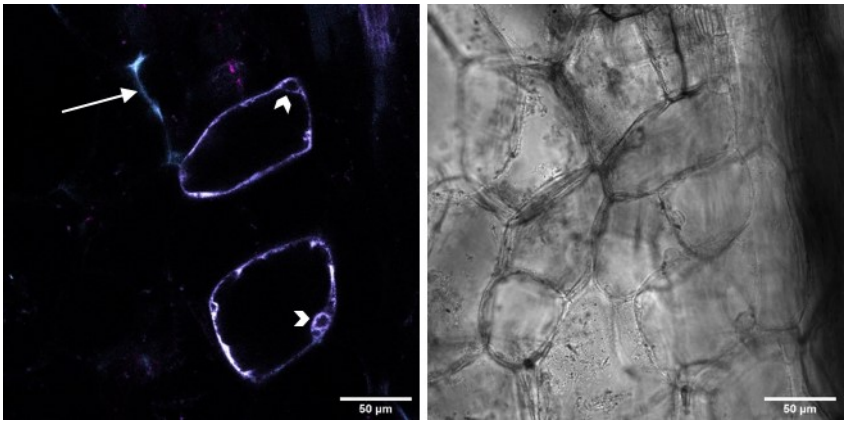


Figure IV.4 : Observation au microscope confocal de cellules de la pulpe de Grenache exprimant la fusion PM-Apo+1.5 pHluorine 15 jours après agro-infiltration. Le signal fluorescent est retrouvé sous forme réticulaire en périphérie des cellules et autour du noyau (indiqué par une tête de flèche) ce qui suggère une localisation dans le réticulum endoplasmique. L'auto fluorescence est indiquée par une flèche. Superposition du signal après excitation à 476 nm (cyan) et 496nm (magenta).

Des infiltrations de baies avec la PM-Apo-Acidine4 ont également été réalisées mais la perte de 100% des vignes en culture en 2020 n'a pas permis d'analyser les baies transformées.

2. Marquage de l'espace apoplasmique avec de l'oregon green seul ou couplé au dextran

L'Oregon Green est une sonde dérivée de la fluorescéine (Figure IV.5 A) dont les propriétés de fluorescence sont sensibles au pH et qui possède un faible pKa (4,7) qui permet d'élargir la gamme de pH étudiée vers des valeurs plus acides (Figure IV.5-B). L'Oregon Green permet d'obtenir des données de pH ratiométriques après une double excitation à 476

et 496nm dans une gamme acide allant de 3 à 6 (Martinière et al 2018). Couplé à du dextran, une molécule de haut poids moléculaire (10kDa), l'Oregon Green n'est pas internalisé et a permis de réaliser des mesures de pH apoplasmique dans des feuilles de *Vicia faba*, d'orge et de maïs et également dans la partie mature de la racine d'Arabidopsis (Felle and Hanstein 2002 ; Felle et al., 2005 ; Geilfus et al., 2015 ; Martinière et al., 2018).

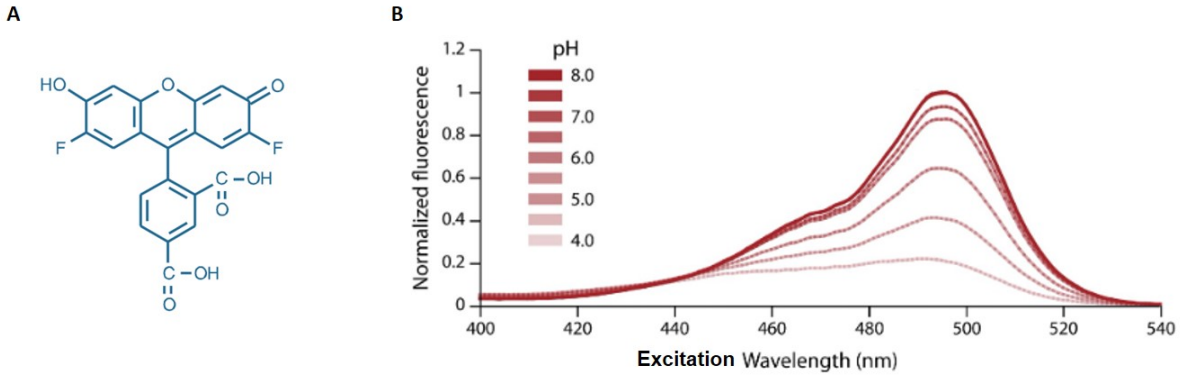


Figure IV.5 : L'Oregon Green 488 est un fluorochrome vert sensible au pH qui pénètre entre les cellules et a déjà été utilisé pour marquer l'apoplasme. A) Molécule de l'Oregon green B) Profil de fluorescence de l'oregon green en fonction du pH. D'après Johnson et Spence, 2010 et DiCioccio et Steinberg, 2011.

Dans un premier temps, des coupes de baies ont été incubées avec de l'Oregon Green et de l'iodure de propidium (IP). L'IP est un fluorochrome rouge, marqueur de la viabilité des cellules et qui se lie à la paroi pectinique. La co incubation avec ces deux sondes fluorescentes permet de déterminer la localisation du marquage de l'Oregon Green. Ces essais ont été réalisés sur des baies du cépage Cabernet Sauvignon, un cépage très utilisé en recherche, faute de Grenache disponible.

Après 15min d'incubation avec de l'Oregon Green 20µM et de l'iodure de propidium 3µM dilué dans une solution de saccharose + CaCl2 100µM et KCl 5mM, le marquage de l'Oregon Green (cyan) semble être localisé au niveau du cytosol alors que le marquage de l'iodure de propidum (rouge) reste en périphérie des cellules (Figure IV.6 A). Ainsi, l'Oregon Green est trop rapidement internalisé dans les cellules de la pulpe pour permettre de réaliser des mesures de pH dans l'apoplasme.

Dans un second temps et pour contourner la rapide internalisation de l'Oregon Green, des essais ont été réalisés avec de l'Oregon Green couplé au dextran. Après 15min d'incubation avec de l'Oregon Green dextran et 15min de rinçage, on observe un marquage en

périphérie des cellules de la pulpe (Figure IV.6 B, flèche) et aucun marquage intracellulaire. Cependant, ce marquage n'est pas net et semble être associé à des débris de surface qui ne sont pas éliminés malgré les rinçages.

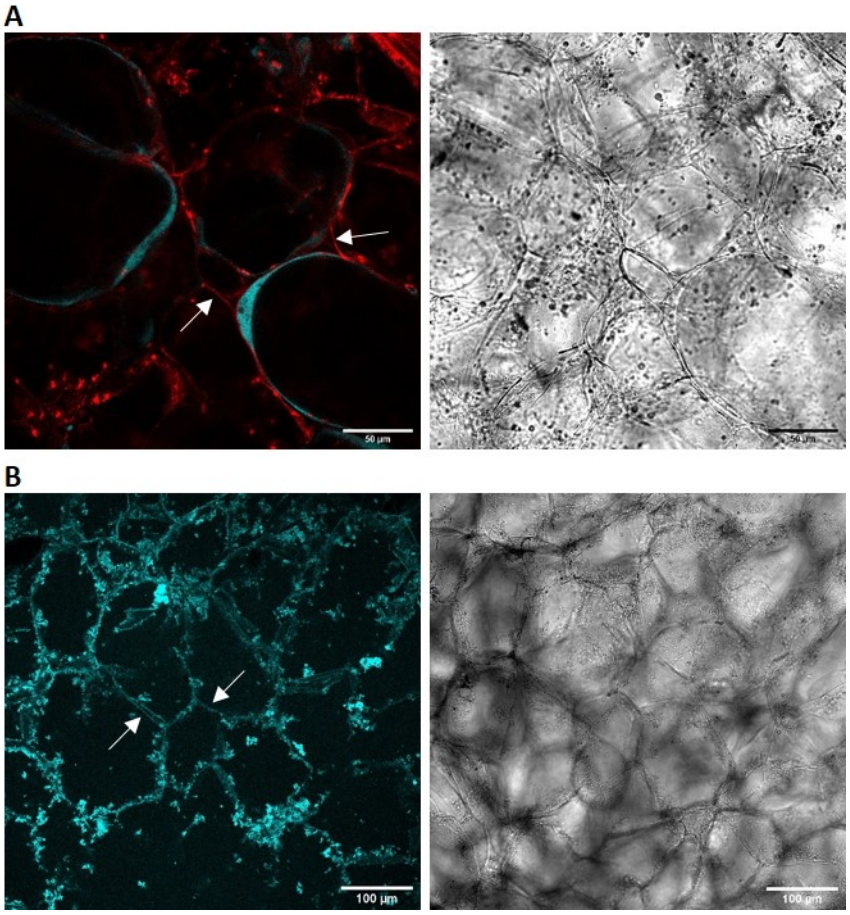


Figure IV.6 : Observation au microscope confocal de coupes de baies de cabernet sauvignon marquées au niveau de la paroi A) Marquage 15min avec l'oregon green (20µM) + iodure de propidium (3µM) et 15min de rinçage. L'iodure de propidium marque la paroi pectinique (indiqué par une flèche). En B) Marquage avec l'oregon green dextran (20µM) après 15min d'incubation et 15min de rinçage. L'oregon green dextran semble marquer la paroi (indiqué par une flèche) mais aussi de nombreux débris en surface. Cyan, oregon green. Rouge, iodure de propidium.

En conclusion, l'Oregon Green 488 n'a pas permis d'obtenir un marquage exclusivement dans l'apoplasme et exploitable. Bien que compatible avec les pH acides, l'Oregon Green seul ou couplé au dextran ne s'avère pas être un outil adapté dans nos conditions de marquage pour obtenir des valeurs de pH dans l'espace apoplasmique des cellules de la pulpe de raisin.

3. Marquage des parois pectiniques avec l'iodure de propidium et le COS^{488}

Dans l'intention d'élargir les outils permettant d'étudier l'espace apoplasmique des cellules de la pulpe, des essais ont été réalisés avec des sondes marquant les parois pectiniques : l'IP et le COS^{488}. Ces deux sondes ciblent le polysaccharide le plus abondant des pectines : l'homogalacturonane (HG). L'IP interagit avec les HGs déméthylés et entre en compétition avec le Ca^{2+} (Round et al., 2011). Le COS^{488} (Chitosan OligoSaccharide) est une sonde qui se lie spécifiquement au niveau de blocs d'HGs déméthylés et qui fluoresce grâce au fluorochrome Alexafluor 488 (Mraveck et al., 2014). Le degré de méthylation des HGs jouant un rôle important dans le développement (Wolf et al., 2009), nous avons voulu obtenir des informations sur le degré de méthylation des HGs dans la paroi pectinique des cellules de la pulpe de raisin. La co-incubation de ces deux sondes permet d'étudier la composition de la paroi pectinique et de détecter la présence éventuelle de patron de méthylation particulier. Après une heure d'incubation avec du COS^{488} (1µL/mL) et de l'IP (3µM), un signal fluorescent est observé en contour de cellules pour les deux fluorochromes (cyan pour le COS^{488} et magenta pour l'IP) (Figure IV.7 A). A première vue, les marquages au COS^{488} et à l'IP semblent colocaliser. Lorsque l'on réalise un zoom sur une jonction intercellulaire, on remarque une concentration du signal fluorescent pour le COS^{488} mais pas pour l'IP (Figure IV.7 B). Cette différence d'intensité de marquage pourrait indiquer la présence d'une concentration de pectines déméthylées en bloc aux angles des cellules de la pulpe de raisin.

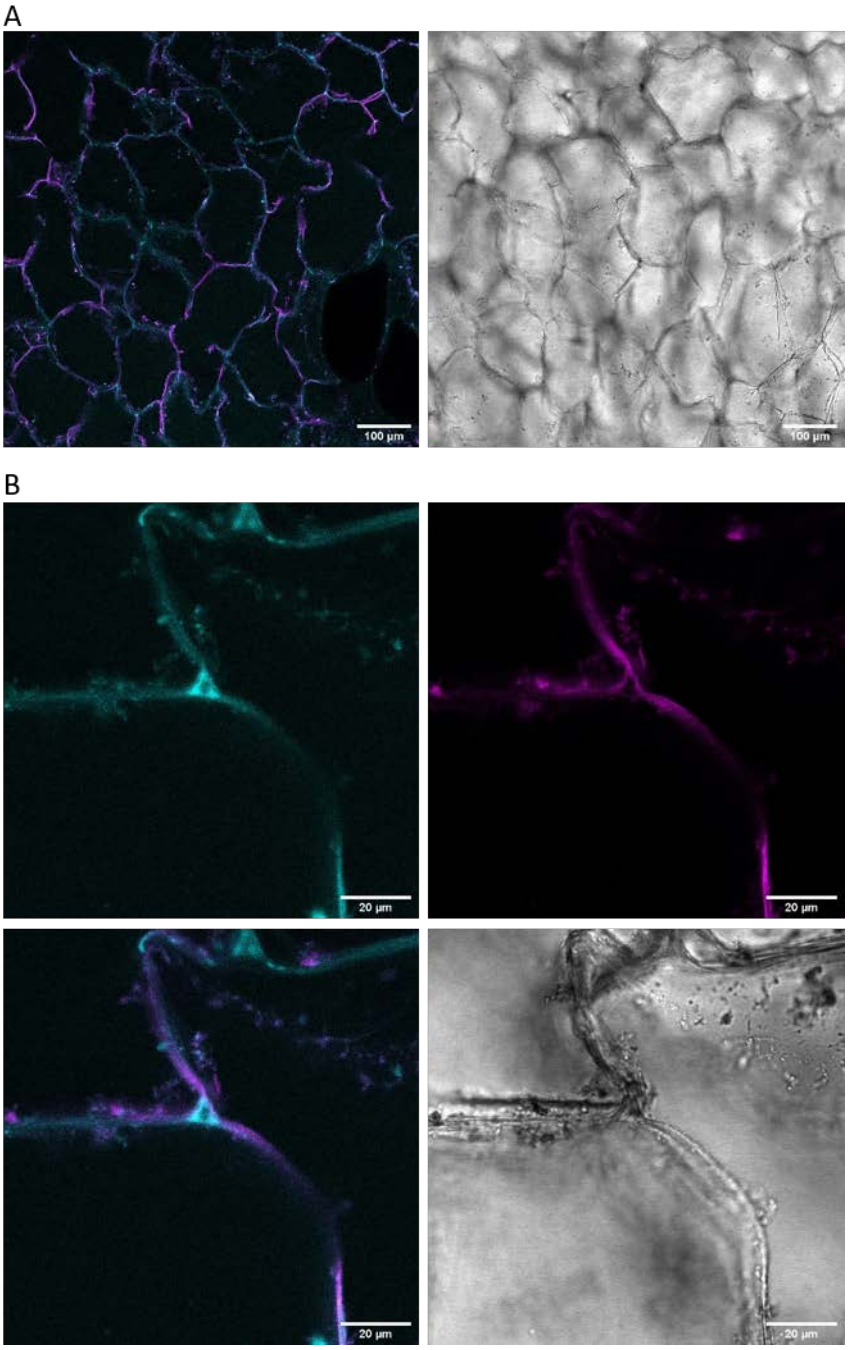


Figure IV.7 : Observation au microscope confocal de coupes de baies d'Ugny blanc au stade vert co-marquées avec le COS^{488} (1µL/mL) et l'iodure de propidium (3µM). A) Marquage obtenu en périphérie de cellules après 1h d'incubation. B) Zoom d'une jonction intercellulaire. COS^{488} (cyan) et IP (magenta).

Ces résultats préliminaires sur l'utilisation du COS^{488} et de l'IP sur cellules de la pulpe de raisin ont permis d'obtenir des marquages fluorescents des parois pectiniques. La présence d'un signal fluorescent en contour des cellules permet de valider le COS^{488} comme un outil pouvant être utilisé sur des cellules de mésocarpe de baie de raisin. Le COS^{488} et l'IP

semblent colocaliser en contour de cellules. En revanche, lorsque l'on regarde à un niveau de détails dans les jonctions intercellulaires, on observe une distribution différente du marquage fluorescent entre les deux sondes. En effet, seul le COS^{488} semble s'accumuler dans l'espace entre les cellules alors que l'IP marque uniquement les contours de cellules. Cette observation suggère la présence d'HGs fortement déméthylés au niveau des jonctions intercellulaires des cellules du mésocarpe de baies. La présence d'HGs fortement déméthylés au niveau des jonctions intercellulaires est déjà décrite dans d'autres espèces et d'autres organes (Mraveck et al., 2014 ; Wilkop et al., 2019).

II. Mesure du pH vacuolaire :

Afin d'obtenir des informations sur le pH des vacuoles des cellules de la pulpe au cours du développement, différents outils ont été utilisés : une version vacuolaire du senseur de pH Acidine2 et les sondes chimiques fluorescentes 2',7'-bis-(2-carboxyethyl) -5-(and-6)-carboxy_fluorescein, acetoxymethyl ester (BCECF-AM), Oregon Green et la fluorescein-5-(and -6)-sulfonic, trisodium salt (FSTS).

1. Expression de la fusion AtAleu-Acidine2 dans la vacuole

Des raisins appartenant au cépage Grenache sont transformés par agro-infiltration avec la fusion entre l'Acidine2 et le signal d'adressage vacuolaire de l'ALEURAINE d'Arabidopsis. Entre 10j à 3 semaines après transformation des raisins, des observations sont réalisées au microscope confocal afin de valider la présence d'un signal fluorescent.

Des observations de coupes de Grenache à différents stades de développement : stade vert, véraison et maturité ont été réalisées. Les baies au stade vert ont été prélevées lorsqu'elles sont encore fermes, les baies au stade véraison ont amorcé un changement de couleur et commence à s'assouplir. Enfin, les baies au stade de maturité ont été prélevées lorsqu'elles présentaient une coloration rouge, un ramollissement plus marqué qu'au stade véraison mais encore suffisamment fermes de réaliser de fines coupes au vibratome.

Les baies transformées avec l'AtAleu-Acidine2 sont coupées en fines sections de 150 à 200µm d'épaisseur et montées entre lame et lamelle dans une solution de saccharose allant de 350mM pour le stade vert à 500mM pour le stade maturité + $CaCl_2$ 100µM et KCl 5mM. Les échantillons observés présentent une minorité de cellules fluorescentes. Dans les cellules qui expriment la fusion, on retrouve un signal fluorescent au niveau de la vacuole centrale turgescente qui remplit quasiment tout le volume intracellulaire (Figure IV.8). L'intensité de

fluorescence est codée par la couleur cyan qui représente le signal de la TagBFP2 (excitation 405nm) et le signal magenta qui représente le signal de la mRFP1 (excitation 561nm). Une grande diversité d'intensité de signal fluorescent est observée allant du cyan majoritaire (plus acide) en passant par une couleur intermédiaire (Figure IV.8.A) jusqu'au magenta majoritaire (plus alcalin) (Figure IV.8.B). Ces différences d'intensité de fluorescence suggèrent une forte hétérogénéité de pH au sein de la vacuole centrale des cellules de la pulpe. Un signal fluorescent d'une forte intensité est aussi observé en périphérie des cellules qui correspond vraisemblablement à de l'autofluorescence (Figure IV.8. C). En revanche, avec les réglages d'intensité de laser utilisés, aucun signal autofluorescent n'est détecté dans la vacuole dans les coupes contrôles non transformées.

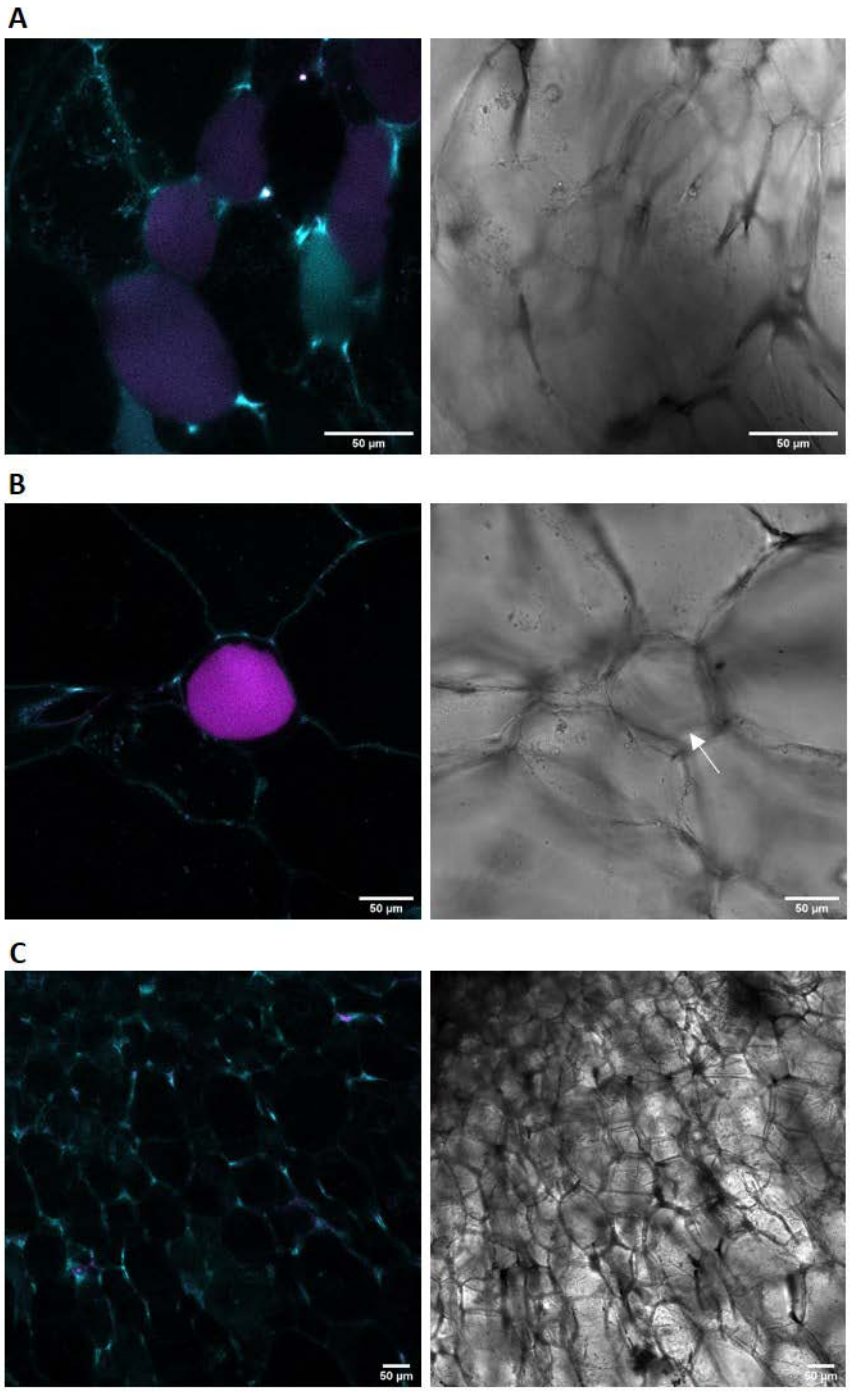


Figure IV.8 : Observation au microscope confocal de coupes de baie de Grenache au stade vert 3 semaines après transformation avec la fusion vacuolaire AtAleu-Acidine2. A) Plusieurs vacuoles de cellules de la pulpe sont marquées sur une même coupe. Certaines vacuoles semblent très acides (cyan majoritaire). B) Marquage d'une vacuole légèrement plasmolysée qui semble moins acide que les vacuoles marquées en A. La flèche blanche pointe la vacuole qui est rétractée. C) Coupe de baie contrôle non infiltrée, de l'auto fluorescence est observée uniquement en contour de cellules. Superposition des deux canaux de fluorescence de la TagBFP2 (cyan) et de la mRFP1 (magenta).

L’intensité de fluorescence de la mRFP1 et de la TagBFP2 a été mesurée dans la vacuole à partir de coupes de baies observées à différents stades de développement pour obtenir un ratio de fluorescence mRFP1/TagBFP2 (561/405). De plus, une gamme *in situ* a été réalisée avec de l’Acidine2 produite en bactérie, purifiée et diluée dans des tampons de différents pH (Figure IV.9-A). A partir de cette gamme, on peut déterminer les pH vacuolaires des échantillons analysés. Ainsi, les pH vacuolaires mesurés au stade vert ont une valeur moyenne de 3,64. Au stade de véraison, le pH diminue légèrement de façon non significative à 3,58. Enfin, à maturité, le pH mesuré augmente pour atteindre une valeur de 4,46.

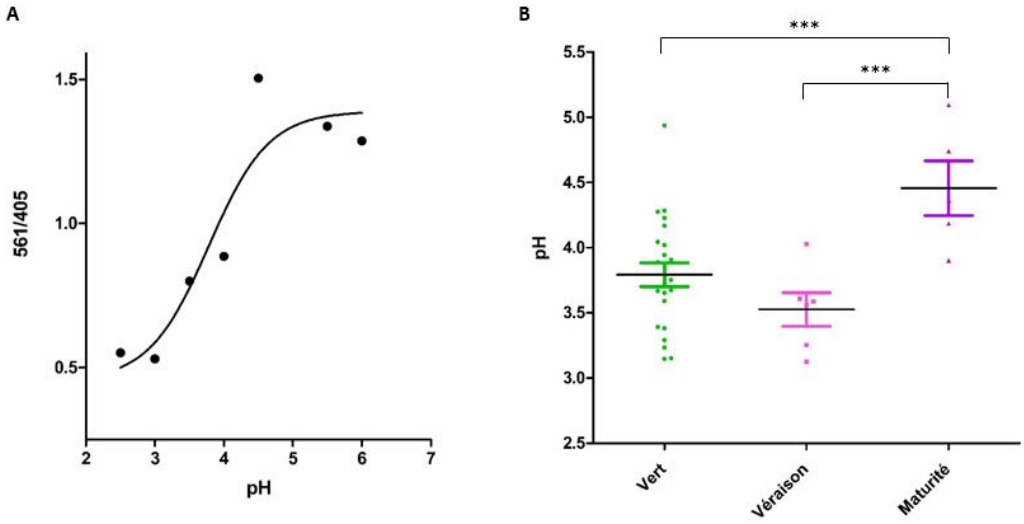


Figure IV.9 : Mesure du pH vacuolaire de cellules de baies de Grenache exprimant le senseur fluorescent AtAleu-Acidine2. On observe une évolution du pH vacuolaire en fonction du stade de développement. A) Gamme *in situ* de l’Acidine2 utilisée pour l’obtention des valeurs de pH à partir de ratios de fluorescence (561/405). B) Le pH vacuolaire augmente au cours du développement de la baie (vert, baie non colorée, rose, stade véraison et violet, baie mature), n=1 à 4 baies et 5 à 23 vacuoles par stade de développement. Test de Kruskal-Wallis $p < 0,05$.

L’expression de la fusion AtAleu-Acidine2 donne des résultats prometteurs car *i)* On retrouve du signal fluorescent exclusivement dans la vacuole des cellules de la pulpe *ii)* Les ratios mesurés sont compris dans la phase exponentielle de la gamme de calibration *iii)* Les quelques mesures réalisées paraissent en partie cohérentes avec ce qui est connu du pH des raisins au cours du développement. Néanmoins, le faible nombre de cellules fluorescentes nous a poussé à élargir les outils dont nous disposions pour réaliser des mesures de pH vacuolaires.

2. Marquage de la vacuole avec des sondes fluorescentes Oregon Green 488, le BCECF-AM et le FSTS

A) Marquage de la vacuole avec de l'Oregon Green 488

Lors des essais pour marquer l'apoplasme des cellules de la pulpe avec de l'Oregon Green 488, une internalisation rapide de la sonde a été constatée. Cette approche a donc été utilisée pour tenter de marquer la vacuole centrale des cellules de la pulpe puisque les vacuoles des cellules de la pointe racinaire d'Arabidopsis sont marquées en 5min d'incubation (données non publiées de l'équipe KalipHruit).

Des coupes de cabernet sauvignon ont été incubées 15min dans de l'Oregon Green 20µM puis rincées pendant 15min avant observation au microscope confocal. Un signal fluorescent est observé en périphérie de cellules (Figure IV.10) et correspond à une localisation cytosolique comme celui présenté Figure IV.6-A. On peut également observer du marquage dans la vacuole centrale d'une cellule (Figure IV.10, flèche). Cependant, très peu de cellules présentent du marquage dans la vacuole même en allongeant le temps d'incubation. Le marquage de la vacuole avec l'Oregon Green 488 est trop rare pour permettre des mesures de pH.

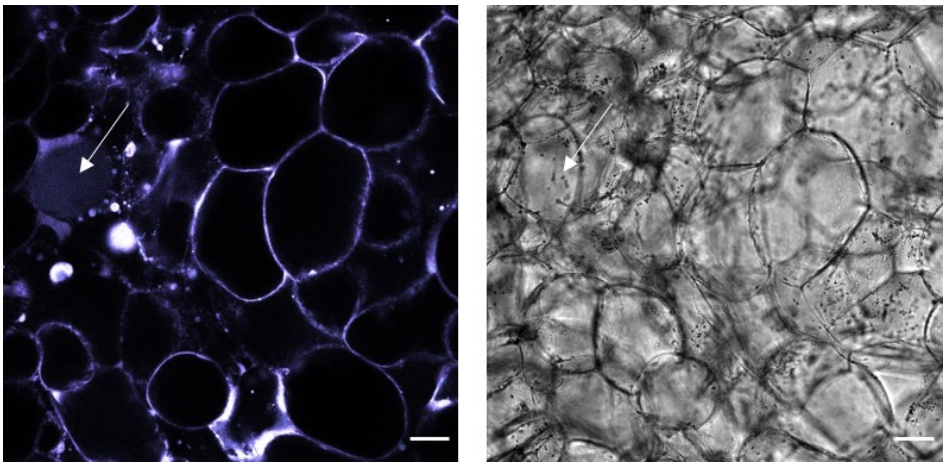


Figure IV.10 : Observation au microscope confocal de coupes de baie de Cabernet Sauvignon au stade vert après 15min d'incubation et 15min de rinçage avec 200µM d'Oregon Green 488. Superposition des deux canaux 476 (cyan) et 496nm (magenta). L'Oregon Green pénètre rapidement dans les cellules mais le marquage est majoritairement en contour de cellules. Une seule vacuole est fluorescente et est indiquée par une flèche. Echelle = 50µm.

B) Marquage de la vacuole avec du BCECF-AM

Le BCECF-AM est une molécule dérivée de la fluorescéine qui a la capacité de pénétrer dans les cellules. Une fois dans la cellule, le BCECF-AM est hydrolysé par une estérase en BCECF qui a des propriétés de fluorescence dépendantes du pH (Figure IV.11). Avec un pKa de 6,98, cette sonde utilisée selon un mode ratiométrique avec une double excitation 458 et 488nm a déjà permis de réaliser des mesures de pH dans la vacuole de cellules d'épiderme de racine d'Arabidopsis et de tabac (Krebs et al., 2010 ; Martinière et al., 2013).

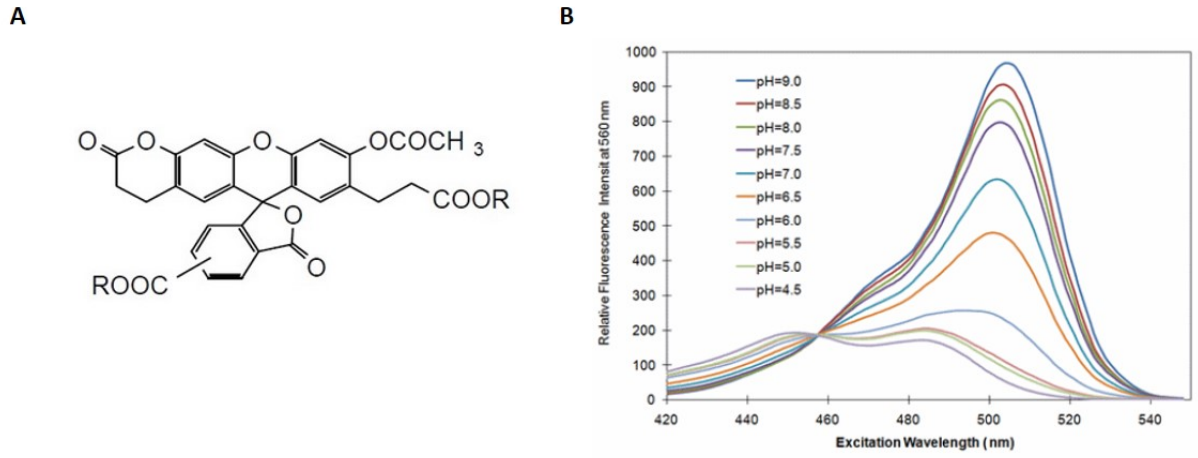


Figure IV.11 : Le BCECF-AM est une sonde dérivée de la fluorescéine qui a la capacité de pénétrer dans les cellules et d'y acquérir des propriétés de fluorescence après hydrolyse de l'acétoxyméthyle ester. A) Molécule BCECF-AM. B) La sensibilité au pH du BECF est optimale au-dessus de pH6. D'après Johnson et Spence, 2010 et ABP Biosciences.

Après 45min d'incubation dans 10µM de BCECF-AM et 1h15 de rinçage, le BCECF a pénétré dans les cellules de la pulpe et de la fluorescence est observée, ce qui signifie qu'il a été clivé et que les cellules sont vivantes. Le marquage observé est localisé dans la vacuole centrale et d'autres structures plus petites qui pourrait correspondre à des petites vacuoles lytiques (Figure IV.12). La couleur magenta correspond à la fluorescence après excitation à 488nm et la couleur cyan correspond à l'excitation du BCECF à 458nm. Une hétérogénéité d'intensité de fluorescence est observée au sein d'une même cellule et entre les cellules suggérant une hétérogénéité des pH au sein des vacuoles. De plus, la couleur cyan est majoritaire, ce qui signifie que les ratios de fluorescence (488/458) sont faibles donc le pH acide (Figure IV.13-A).

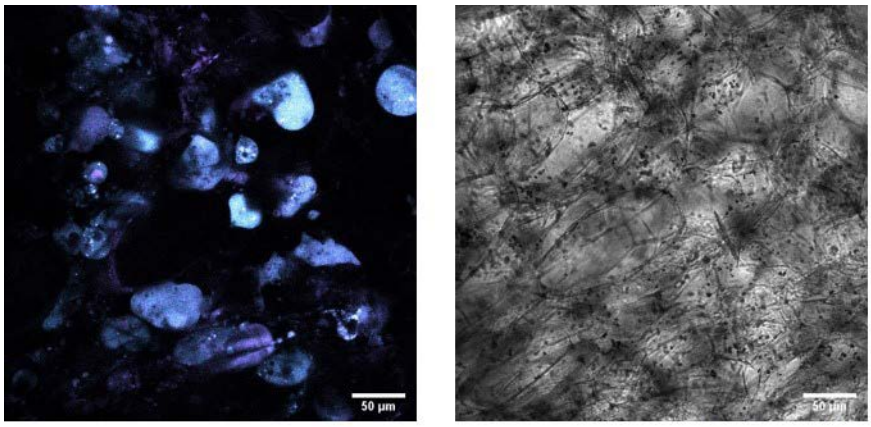


Figure IV.12 : Observation au microscope confocal de coupes de baie de Cabernet Sauvignon au stade vert incubée avec 10µM de BCECF-AM pendant 45min puis rincée pendant 1h15. La fluorescence observée après excitation du BCECF-AM à 458 (cyan) et 488nm (magenta) est présente dans les vacuoles des cellules de la pulpe.

Lorsque l'on réalise une gamme de calibration *in situ* avec les mêmes réglages que ceux utilisés pour obtenir les acquisitions, on obtient une gamme de calibration à partir des ratios de fluorescence 488/458 nm dont l'amplitude est maximale entre pH 6,5 et 8,5 (Figure IV .13 A). Lorsque l'on compare les ratios de fluorescence obtenus à la gamme de calibration, on obtient des valeurs de pH variant de pH 5 à pH7 avec une moyenne de 6,56 (Figure IV.13 B). Ces informations de pH sont bien supérieures à celles obtenues avec la fusion AtAleu-Acidine2 et semblent très élevées par rapport aux données disponibles dans la littérature.

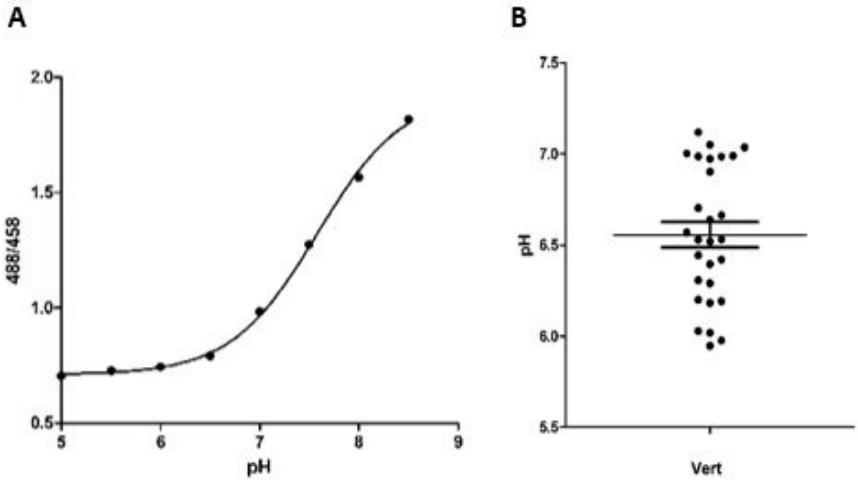


Figure IV.13 : Mesures de pH de vacuoles de cellules de la pulpe de cabernet sauvignon réalisées avec la sonde fluorescente BCECF-AM. A) Gamme de calibration *in situ* des pH en fonction des ratios de fluorescence 488/458 réalisée avec les mêmes réglages que ceux utilisés

pour faire les observations. B) Valeurs de pH mesurées dans 28 vacuoles de coupes provenant d'une seule baie au stade vert.

C) Marquage de la vacuole et mesures de pH avec le FSTS

Le FSTS fait partie de la famille des dérivés de la fluorescéine (Figure IV.14), sonde fluorescente ratiométrique. La fluorescéine et ses dérivés ont permis de réaliser des mesures de pH dans l'apoplasme de la racine primaire d'Arabidopsis (Monshausen et al., 2009 ; 2001). Peu de données sont disponibles sur des mesures de pH in vivo avec le FSTS et du fait de son pKa élevé de 6,4, son utilisation est supposée être limitée dans la gamme des pH très acides. Cependant, cette sonde fluorescente s'est révélée très prometteuse en raison d'une forte sensibilité de ses propriétés de fluorescence aux pH acides (communication personnelle de Matyas Fendrych). Des essais ont donc été réalisés avec le FSTS pour obtenir des informations de pH dans la vacuole des cellules de la pulpe de Grenache au cours du développement.

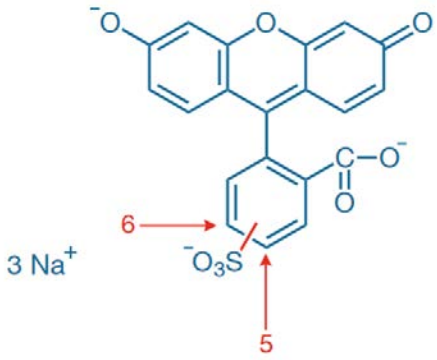


Figure IV.14: Le FSTS est une sonde fluorescente verte ratiométrique dérivée de la fluorescéine. Johnson et Spence, 2010.

Les coupes de baies de Grenache sont incubées 30min dans une solution de FSTS 100µM diluée dans du saccharose + $CaCl_2$ 100µM et KCl 5mM et rincées deux fois. La concentration en saccharose est ajustée entre 350mM et 500mM selon le stade de développement de la baie. Les coupes sont montées entre lame et lamelle et observées au microscope confocal après excitation à 458 et 488nm. La couleur magenta correspond à la fluorescence après excitation à 488nm et la couleur cyan correspond à l'excitation du FSTS à 458nm. Sur les coupes de Grenache, un marquage fluorescent est observé autour des cellules de la pulpe et dans leur vacuole centrale. Sur la figure IV.15 A, on peut observer que de

nombreuses cellules présentent un signal fluorescent périphérique qui tend vers le magenta (alcalin, Figure IV.16-A) et correspond au cytosol. Ce signal est d'une telle intensité de fluorescence qu'il est saturant avec les réglages utilisés pour observer le marquage vacuolaire et ne permet pas d'être analysé pour obtenir des valeurs de pH. La majorité des cellules présentent aussi un signal fluorescent dans la vacuole centrale à dominante cyan, donc plus acide. Sur un certain nombre de cellules observées, un signal fluorescent est observable uniquement dans la vacuole centrale (Figure IV. 15 B et C). De plus, certaines cellules n'ont aucun marquage dans la vacuole centrale.

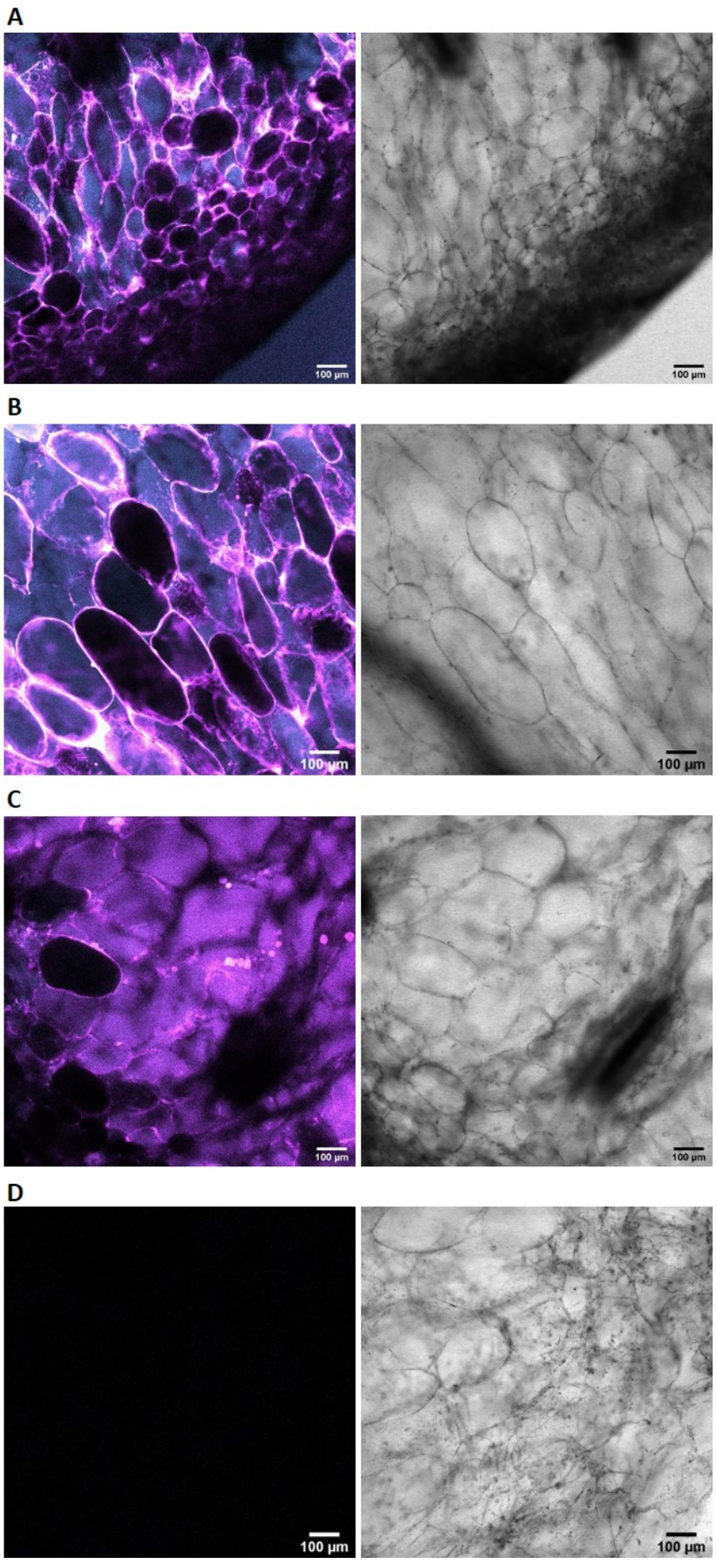

A
100 µm
100 µm
B
100 µm
100 µm
C
100 µm
100 µm
D
100 µm
100 µm

Figure IV. 15 : Observation au microscope confocal de coupes de baies de Grenache au stade vert (A, C et D) et maturité (B) marquées après 30min d'incubation des coupes de Grenache dans du FSTS 100µM. A) et B) Le FSTS pénètre rapidement dans les cellules où il marque le cytosol qui semble alcalin (dominance du magenta) et la vacuole centrale qui semble plus acide (dominance du cyan). Certaines cellules ne présentent pas de marquage périphérique. C) Clamping du pH vacuolaire à l'aide d'un tampon MES-BTP 100mMpH 6,5. Le signal fluorescent est devenu à dominante magenta, indiquant que la sonde réagit bien au pH *in vivo*. D) Coupe de baie non infiltrée. Avec les réglages utilisés, il n'y a pas d'autofluorescence. Cyan= fluorescence à 488nm.Magenta= fluorescence à 458nm.

Afin de valider que le marquage fluorescent observé pouvait donner des informations de pH, un pH de 6,5 a été imposé en incubant des coupes de baies dans un tampon MES-BTP 100mM. Après 30min d'incubation, l'intensité de la fluorescence émise après excitation à 488 et le ratio 488/458 ont augmenté ce qui est interprété comme une augmentation du pH (Figure IV.15 C). Le ratio obtenu dans ce contexte correspond à un pH de 5,98 selon la gamme de calibration *in situ* (Figure IV.16 A). Le pH est donc imposé dans la vacuole après 30min d'incubation ce qui signifie que la fluorescence du FSTS répond bien aux variations de pH et est susceptible d'apporter des informations de pH.

Grâce au FSTS, les pH ont été mesurés dans les vacuoles de baies de Grenache à différents stades (Figure IV.16 B). On observe une augmentation du pH au cours du développement. En effet, au stade vert, le pH moyen mesuré dans la vacuole centrale est de 3,52, il augmente à 3,93 au stade de véraison puis atteint 4,00 à maturité. Les pH vacuolaires mesurés entre le stade vert et le stade de véraison sont significativement différents contrairement à ceux mesurés à véraison et maturité.

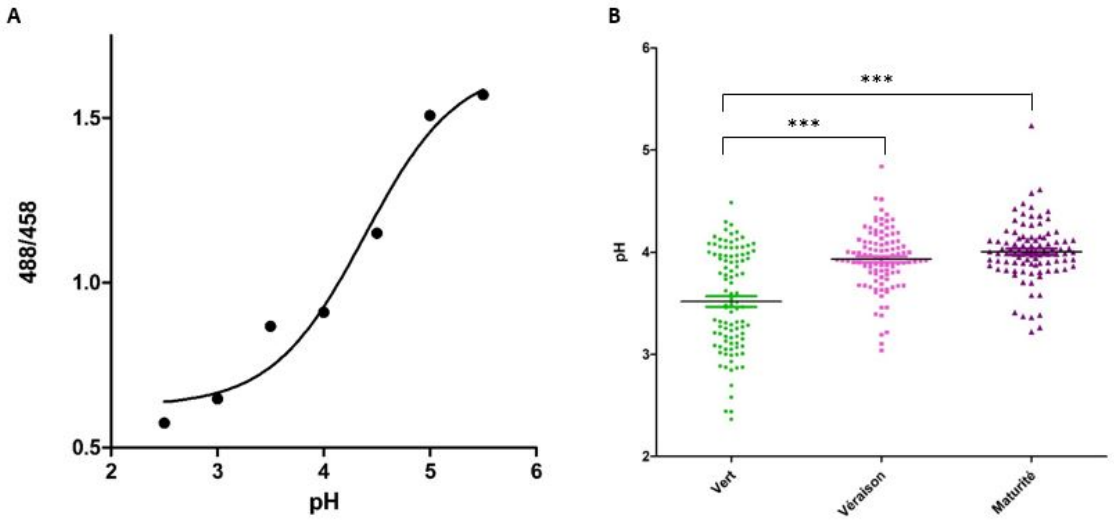


Figure IV.16 : Evolution du pH vacuolaire en fonction du stade de développement. A) Gamme FSTS in situ utilisée pour obtenir des valeurs de pH à partir de ratio de fluorescence (488/458). B) Le pH vacuolaire augmente au cours du développement de la baie (vert, baie non colorée, rose, stade véraison et violet, baie mature), n=3 baies et ~100 vacuoles par stade de développement. Test de Kruskal-Wallis p< 0,0001.

Les données de pH vacuolaire obtenues avec la fusion AtAleu-Acidine2, le FSTS et le pH du jus des baies, qui ont servies à ces analyses, et qui est mesuré au pH-mètre après broyage des baies au pilon et mortier sont comparées (Figure IV.17). On observe une même tendance pour les données obtenues avec le FSTS et les données obtenues sur le jus pressé des baies : une augmentation du pH au cours du développement de la baie. Cependant, l'écart entre le pH à véraison et à maturité est plus marqué avec le pH du jus. Concernant les données obtenues avec la fusion vacuolaire AtAleu-Acidine2, le pH au stade de véraison semble légèrement plus acide mais ces données doivent être interprétées avec précaution compte tenu du faible nombre de mesures.

De plus, on retrouve des différences de pH vacuolaires pour un même stade de développement avec les différents outils utilisés. En effet, les valeurs de pH vacuolaires mesurées avec l'acidine2 et le FSTS sont supérieures aux valeurs de pH mesurées à partir du jus pressé. En effet, le pH du jus pressé évolue de 3,11 au stade vert à 3,30 au stade de véraison et atteint 3,61 à maturité.

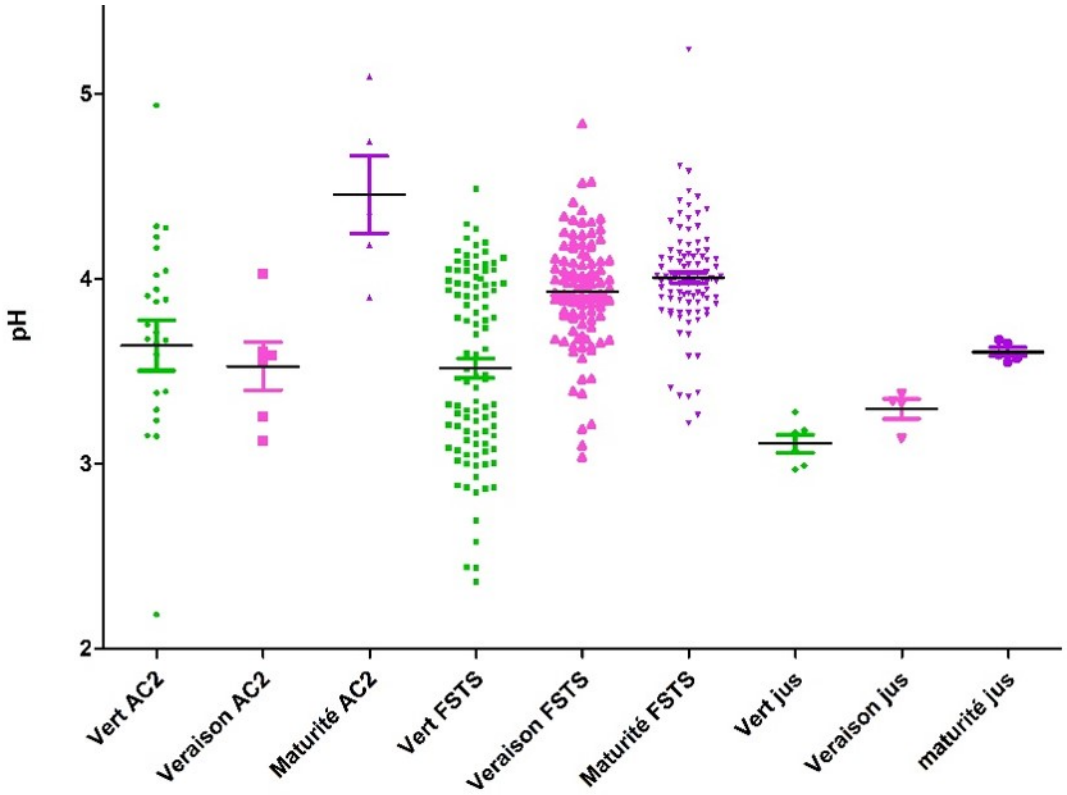


Figure IV.17 : Compilation des données de pH obtenues dans la vacuole avec l'AtAleu-Acidine2 et le FSTS et le pH du jus pressé en fonction du développement. Ac2= données de pH vacuolaire obtenues avec la fusion AtALEURAINE-Acidine2, jus= données de pH obtenues avec un pH-mètre à partir du jus pressé.

Discussion :

Le pH des deux compartiments les plus acides des cellules de la pulpe, la vacuole et l'apoplasme, joue un rôle essentiel dans la croissance et la qualité des raisins. Le pH de la baie se situe dans des valeurs très acides et augmente progressivement au cours du développement du fait la diminution du contenu en acides organiques (consommation du malate par la respiration cellulaire et dilution par augmentation du volume) et de l'augmentation du K^+ qui va partiellement neutraliser l'acide tartrique. Cependant, peu de données sont disponibles sur le pH des raisins à l'échelle cellulaire et subcellulaire. Ce chapitre décrit une partie de mon travail de thèse visant à cartographier *in vivo* le pH de l'apoplasme et de la vacuole des cellules de la pulpe de raisin au cours du développement. Deux approches ont été utilisées : la transformation transitoire de raisins avec des biosenseurs de pH génétiquement encodés et l'utilisation de sondes chimiques permettant de mesurer le pH. Ces deux catégories d'outils ont des propriétés de fluorescence qui sont sensibles aux variations de pH et font appel à des

techniques de microscopie pour les observer. La fluorescence résultant de l'expression des biosenseurs de pH ou du marquage des sondes est observée sur des coupes de baies fraîches.

1. Etude du pH apoplasmique

La composition ionique et le pH de l'apoplasme sont des régulateurs clés du métabolisme pariétale de nombreux tissus de plantes et particulièrement chez les fruits charnus. Chez la vigne, peu de données sont disponibles sur les variations de pH apoplasmique au cours du développement. Une étude a mis en lumière une forte hétérogénéité de pH apoplasmique et de son évolution à maturité entre les cépages Merlot et Concord (Keller et Shrestha, 2014). De plus, chez la tomate *Lycopersicon esculentum* Mill., un autre fruit charnu non climactérique, la chute du pH apoplasmique à maturité a été associée à une régulation de l'activité d'enzymes participant au relâchement de la paroi et au ramollissement du fruit (Almeida et Huber, 2002).

Pour mesurer le pH apoplasmique au cours du temps, l'expression transitoire du senseur de pH PM-Apo+1,5-pHluorine et la sonde fluorescente Oregon Green 488 ont été utilisés. L'agroinfiltration des raisins est utilisée depuis plusieurs années dans le laboratoire d'Ecophysiologie et Génomique Fonctionnelle de la Vigne à Villenave d'Ornon et son efficacité a été démontrée à plusieurs reprises. Malheureusement, dans le cas de l'expression de la fusion PM-Apo-pHluorine, les résultats n'ont pas été au rendez-vous à cause d'une retenue du senseur dans le réticulum endoplasmique. La forme PM-Apo est réalisée par la fusion de la pHluorine avec le peptide signal de la chitinase et un domaine transmembranaire de 26 acides aminés (Martinière et al., 2018). L'adressage d'une protéine de type I dans une membrane de la cellule est assurée par un domaine transmembranaire unique dont la longueur détermine le type de membrane, RE, Golgi ou membrane plasmique (Brandizzi et al., 2002). En fusionnant la GFP avec un domaine transmembranaire d'une protéine humaine lysosomale, Brandizzi et ses collaborateurs ont démontré qu'un domaine transmembranaire de 23 acides aminés permettait d'ancrer le senseur à la membrane plasmique des cellules d'épiderme de tabac. La taille du domaine transmembranaire semble devoir correspondre à l'épaisseur de la membrane ciblée pour que la protéine s'y ancre. De plus, il semble aussi que ces processus soient espèce dépendant puisque la pHluorine est ancrée à la membrane plasmique des cellules racinaires d'Arabidopsis grâce à ce même domaine transmembranaire mais qui possède une taille de 26 acides aminés (Martinière et al., 2018). En épiderme de tabac, lorsque la GFP est fusionnée à un domaine transmembranaire a une taille de 17 acides aminés, elle est retenue dans le réticulum endoplasmique (Brandizzi et al., 2002). La

mauvaise localisation de la PM-Apo-pHluorine dans les cellules de la pulpe pourrait s'expliquer par une taille du domaine transmembranaire inadaptée. On peut ainsi supposer que le domaine transmembranaire de 26 acides aminés utilisé dans la fusion PM-Apo-pHluorine a une taille trop faible pour permettre son ancrage dans la membrane plasmique des cellules de la pulpe. Une autre hypothèse qui pourrait expliquer ce phénomène et qui est certainement la plus plausible est que les cellules sont stressées. En effet, le blocage du trafic des protéines dans le système de sécrétion et leur rétention dans le réticulum est un marqueur de stress cellulaire qui se traduit le plus souvent par une rétention des protéines dans le réticulum endoplasmique. De plus, la culture de la vigne doit répondre à un certain nombre de critères et les vignes que nous avons utilisées se sont développées dans des conditions de culture (serre de niveau S2 autorisant la transformation) qui n'étaient pas optimales ce qui peut générer du stress à l'échelle de toute la plante. On peut également considérer que la coupe des baies au vibratome entraine du stress dans les cellules.

Le FSTS ayant donné des résultats prometteurs sur le pH de la vacuole, il serait intéressant de l'utiliser pour mesurer le pH de l'apoplasme. Néanmoins, comme il pénètre rapidement dans les cellules il faudrait le fusionner à un domaine de liaison à la cellulose comme cela a été fait avec l'Oregon green (Fasano et al., 2001) ou au dextran. Aussi, au cours de la maturité, Keller et Shrestha (2014) ont montré une évolution du pH apoplasmique entre 4,5 et 3,7 pour le Merlot et entre 4 et 5 pour le Concord. Compte tenu de ces pH, il faut envisager d'utiliser les PM-Apo Acidine2 et Acidine4 pour réaliser des mesures de pH apoplasmique dans les cellules de la pulpe de Grenache.

Chez la vigne, un lien entre pH et degré de méthylation est suggéré par la présence de deux membres de la famille de PMEs dans des QTLs liés au pH (Duchêne et al., 2012). Des essais ont été réalisés avec le COS^{488}, une sonde qui se lie spécifiquement aux blocs d'HGs déméthylées et permet d'obtenir des informations sur la composition de la paroi pectinique. Le marquage au COS^{488} obtenu dans les cellules de la pulpe d'Ugny blanc au stade vert révèle que c'est un outil approprié pour obtenir des informations sur le degré de méthylestérification des pectines dans la baie de raisins. Nos résultats montrent un fort marquage au COS^{488} au niveau de jonctions intercellulaires évoquant la présence d'homogalacturonanes déméthylés dans cette région. Un résultat similaire a été obtenu chez le kiwi à l'aide d'anticorps JIM 5 spécifiques des pectines déméthylées. A maturité, le marquage au JIM5 est supérieur chez une variété de kiwi arrivant qui a une période de maturation courte comparé à une variété qui arrive lentement à maturité (Fullerton et al., 2020). Dans cette étude, les auteurs proposent un

lien entre état de méthylation des pectines et vitesse de maturation du fruit. Chez la fraise *Fragaria vesca,* la surexpression de *FvPME38* et *FVPME39* conduit à un murissement accéléré du fruit et un ramollissement plus important (Xu et al., 2020). Au cours du développement des fruits charnus, la composition de la paroi des cellules évolue pour permettre leur ramollissement. Chez la vigne *Vitis vinifera*, une augmentation de la solubilité des polysaccharides pectiniques a été remarquée (Nunan et al., 1998). De plus, à partir de la véraison, l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans le remodelage de la paroi est modifiée. Parmi eux, des gènes codant pour des PMEs avec divers niveaux et cinétiques d'expression suggérant une modification de l'état de méthylestérification des pectines au cours de la maturité (Glissant et al., 2008). Dans des baies d'Ugny blanc, une étude a montré que le degré de méthylation des pectines passait de 68% à la véraison à moins de 20% à maturité (Barnavon et al., 2001). L'utilisation du COS^{488} sur des coupes de baies à différents stades de développement pourrait permettre d'apprécier l'évolution du degré de méthylestérification comme cela a été fait avec des anticorps spécifiques des pectines (dé)méthylées chez la pomme (Ng et al., 2013).

Il semble d'autant plus primordial d'étudier l'état de méthylestérification des homogalacturonanes dans la baie de raisin car il ne serait pas uniquement impliqué dans la croissance et l'assouplissement du fruit mais également dans la réponse aux pathogènes. En effet, des variations du degré de méthylation ont été observées sur des baies infectée par le pathogène *Botrytis cinerea* connu pour causer d'importants dégâts sur les rendements de production viticole (Weiller et al., 2021).

2. Etude du pH vacuolaire au cours du développement

Le pH vacuolaire a été analysé au cours du développement de baies de Grenache à l'aide de différents outils : le senseur de pH Acidine2 fusionnée à l'aleuraine et diverses sondes dont les propriétés de fluorescence sont sensibles au pH : l'Oregon Green, Le BCECF et le FSTS. Un faible nombre de cellules de la pulpe exprimaient la fusion AtAleu-Acidine2 et ainsi peu de données de pH a été collectées. Néanmoins, les informations collectées ont permis de mettre en évidence l'existence d'une grande hétérogénéité de pH au sein des vacuoles. Cette hétérogénéité a également été soulignée avec les données obtenues avec le FSTS et sont en accord avec ce qui est publié dans la littérature à propos de l'importante diversité de composition des vacuoles (Fontes et al., 2011). En revanche, la diversité de formes et de structures des vacuoles n'a pas été appréhendée dans cette étude car dans la majorité des cas, seule la vacuole centrale présentait du signal.

La sonde chimique BCECF a permis l'obtention de données de pH plus élevées qu'attendu. Ceci peut s'expliquer par le fait que le BCECF est éteint à des pH acides et par le temps d'incubation nécessaire pour pénétration dans la vacuole. En effet, l'incubation dure une heure et est réalisée dans l'obscurité. Il est possible que ces conditions d'incubation impactent le pH des cellules. Les sondes nécessitant un temps d'incubation plus court sont donc à privilégier.

De façon surprenante, alors que peu décrit dans la littérature comme permettant d'obtenir des données de pH, le FSTS a été le meilleur outil pour obtenir des données de pH vacuolaire en baie de raisin. La gamme de calibration *in situ* a démontré une forte sensibilité au pH jusqu'à pH 3. La pénétration du FSTS dans la vacuole centrale est rapide et permet de marquer une majorité de cellules. Néanmoins, certaines cellules présentaient un marquage intracellulaire pouvant correspondre à une localisation cytoplasmique mais aucun marquage dans la vacuole. On peut émettre l'hypothèse que cette absence de signal fluorescent serait dû à une extinction de fluorescence de la sonde en raison d'un environnement très acide. Cette hypothèse laisse supposer que le pH des vacuoles mesuré avec le FSTS (et aussi le BCECF-AM) est surestimé puisque sont exclues les vacuoles les plus acides. Ainsi, cela expliquerait pourquoi le pH vacuolaire mesuré avec le FSTS est supérieur à celui du jus de baie pressé. Enfin, pour mesurer le pH du jus des baies, ces dernières sont broyées, les cellules des différents tissus éclatent et le contenu des compartiments subcellulaires est mélangé. On peut supposer que des réactions biochimiques ont lieu à ce moment et modifient le pH expliquant la différence de pH observée entre les mesures réalisées dans la vacuole et les mesures du jus. On peut également présumer que les vacuoles des cellules présentent dans les autres tissus comme la peau possèdent des pH plus acides que ceux retrouvés dans les cellules du mésocarpe et tire le pH global vers des valeurs encore plus faibles.

Enfin, les données de pH vacuolaire mesuré dans les baies de Grenache avec l'aleuraine-Acidine2 et le FSTS ainsi que les mesures du pH du jus de baie pressé confirment l'augmentation du pH vacuolaire au cours du développement de la baie. Des données similaires ont été obtenues à partir des cépages Merlot et Concord, suggérant que contrairement au pH apoplasmique, le pH vacuolaire semble évoluer de la même façon pour différents cépages. Il serait intéressant d'élargir ces analyses à d'autres cépages qui sont contrastés en acidité comme le Riesling et le Gewurztraminer pour confirmer le lien de causalité entre pH de la vacuole et acidité des raisins.

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale et perspectives

Les plantes sont des organismes sessiles qui se développent, s'adaptent et répondent à leur environnement tout au long de leur vie. Les mécanismes au cœur de ces processus font souvent intervenir des variations de pH cellulaires et extracellulaires. En particulier, l'homéostasie du pH apoplasmique est impliquée dans de nombreux processus physiologiques importants comme le transport de nutriments, de phytohormones comme l'auxine, dans l'extensibilité de la paroi permettant l'expansion cellulaire et dans la signalisation de réponse aux pathogènes (Kramer and Bennett, 2006 ; Cosgrove 2016 ; Kesten et al., 2019). L'objectif principal de ma thèse était de réaliser une cartographie des pH des cellules de la pulpe de raisin au cours de son développement principalement pour questionner les effets d'une augmentation de température sur l'acidité des baies en lien avec la production viticole. L'aspect environnemental de mon projet n'a pas pu être mené à terme compte tenu des difficultés que nous avons eu à obtenir du matériel végétal exploitable dans les conditions de culture disponibles et des nombreuses contraintes générées par la situation sanitaire. Pour cette raison, mes travaux se sont recentrés sur le développement de nouveaux senseurs et approches pour mesurer les pH *in vivo* et notamment sur leur caractérisation fine pour obtenir des informations de pH en lien avec l'élongation cellulaire.

Ces dernières années, de nombreux efforts ont été déployés pour développer des outils permettant de mesurer le pH *in vivo* le plus finement possible. L'utilisation de sondes chimiques fluorescentes et de biosenseurs de pH génétiquement encodés a notamment permis d'élargir les connaissances sur les mécanismes d'élongation cellulaire dépendant du pH dans la racine primaire d'Arabidopsis (Moreau et al., 2021). De même, ces outils ont été utilisés sur des plantes d'intérêt agronomique comme l'orge, le maïs et la fève en réponse à un stress abiotique (Felle et Hanstein 2002 ; Felle et al., 2005 ; Geilfus et al., 2015).

Au cours du développement des raisins, le pH évolue de pH2,5 à pH3,5 en fin de maturité. Dans la baie de raisin, il semble y avoir une grande hétérogénéité de pH à l'échelle tissulaire et peu d'informations sont disponibles sur le pH à l'échelle cellulaire et subcellulaire. L'apoplasme et la vacuole sont les deux compartiments les plus acides de la cellule. La régulation du pH de ces deux compartiments au cours du développement est primordiale car elle est impliquée d'une part dans le chargement de la baie et d'autre part dans l'acidité globale. Dans ces conditions, le principal facteur limitant pour réaliser des mesures de pH *in vivo* dans les cellules de la pulpe de raisin est la disponibilité d'outils compatibles avec des valeurs de pH inférieures à 4.

Afin de remédier à cet obstacle, nous avons développé de nouveaux senseurs de pH génétiquement encodés qui sont tolérants aux pH acides. Les senseurs de pH génétiquement encodés présentent l'avantage d'être modifiables par l'ajout de signaux de trafic cellulaire permettant de les localiser spécifiquement dans un compartiment choisi et ainsi d'obtenir des informations locales de pH (Martinière et al., 2013). La stratégie choisie a été de fusionner deux protéines fluorescentes qui possèdent chacune un pKa faible et différent permettant une réponse distincte au pH et l'obtention de ratios de fluorescence associés à des variations de pH. Cette stratégie a déjà été utilisée pour développer des senseurs compatibles avec les cellules animales (Tanida et al., 2014 ; Burgstaller et al., 2019) et végétales (Gjetting et al., 2012). Nous avons ainsi caractérisé et développé trois nouveaux biosenseurs de pH : les Acidines 2, 3 et 4 qui reposent sur la fusion de la mRFP avec respectivement la TagBFP2, la Gamillus et la SYFP2. Finalement, la combinaison de ces trois nouveaux biosenseurs de pH permet d'étendre la gamme jusqu'à pH3, une valeur qui était inaccessible avec les senseurs génétiquement encodés déjà existants.

Avant d'être exprimées en plantes, les Acidines ont été produites en bactéries et caractérisée *in vitro* afin de déterminer leurs spécificités de réponse aux variations de pH et aux ions. Ces analyses ont permis de conclure que les spectres d'émission de chaque protéines fluorescentes composant les Acidines fluctuaient bien en réponse aux variations de pH et d'une manière qui permet l'obtention de ratios de fluorescence. Par ces propriétés, les Acidines permettent d'étudier les variations de pH autour de leur pKa qui est respectivement de 3,86, 4,49 et 5,63 pour l'Acidine2, la 3 et la 4.

Ensuite, les Acidines adressées dans l'apoplasme ont été exprimées transitoirement en épiderme de feuille de tabac. La présence de signal fluorescent dans l'apoplasme a permis de conclure que les Acidines s'accumulaient bien dans leur destination à l'exception de l'Acidine3 pour laquelle une partie du signal est présent dans la vacuole. Une absence de fluorescence dans le réticulum suggère qu'elles sont bien tolérées par le système de sécrétion. Enfin, les variations de ratios de fluorescence en réponse à un pH imposé démontrent que les Acidines répondent aux variation de pH *in vivo*.

Puis, les Acidines ont été exprimées stablement en Arabidopsis. Les plantules obtenues ne présentent aucun phénotype suggérant que leur expression n'interfère pas avec les processus développementaux. Aussi, le signal fluorescent est retrouvé en contour de cellules suggérant qu'elles sont bien localisées et bien tolérées. Pour l'Acidine3, le marquage dans la vacuole est toujours présent ce qui nous a conduit à l'écarter de nos travaux plus approfondis. Finalement,

des gammes de réponse *in vivo* ont été réalisées illustrant le fait que les Acidines répondent immédiatement et transitoirement aux variations de pH *in vivo*.

Dans ces conditions, les Acidines 2 et 4 répondent aux critères que l'on attend de biosenseurs de pH génétiquement encodés : *i)* elles n'interfèrent pas avec le développement des plantes, *ii)* leur localisation est conforme à celle ciblée et *iii)* elles répondent immédiatement et réversiblement aux variations de pH *in vivo* et peuvent être exploitées pour explorer le pH subcellulaire.

Ainsi, l'Acidine2 qui est celle qui possède le plus faible pKa a été utilisée pour explorer les variations de pH des raisins au cours de leur développement. Fusionnée au peptide signal de l'aleuraïne, l'Acidine2 a permis de réaliser quelques mesures de pH *in vivo* dans la vacuole centrale de cellules de la pulpe de Grenache ce qui valide l'approche. Les différentes difficultés de culture et de calendrier auxquelles nous avons été confrontées durant ce projet ont permis d'obtenir seulement un faible nombre de bais transformées et exploitables. Cependant, les données préliminaires qui ont été obtenues sont extrêmement encourageantes dans la mesure où elles sont cohérentes avec ce qui est décrit dans la littérature, à savoir une augmentation du pH de la baie au cours de son développement. Afin de consolider les données obtenues sur la vacuole avec l'Acidine2, d'autres approches ont été exploitées et notamment l'utilisation de sondes fluorescentes commerciales jusqu'alors non utilisées en tissu végétal. L'utilisation de la sonde fluorescente dérivée de la fluorescéine, le FSTS s'est avérée très utile et a permis de confirmer l'augmentation du pH vacuolaire au cours du développement. La même tendance a été observée à partir du pH du jus des baies pressées suggérant que le pH de la vacuole mesuré à partir de cellules de la pulpe entières reflète le pH de l'ensemble de la baie. L'acidité de la baie est fortement influencée par l'accumulation du potassium qui neutralise et précipite une partie des acides organiques (Somers 1977 ; Boulton 1980 ; Walker et Blackmore 2012). Au cours de la maturation, le K^+ s'accumule fortement dans la baie de raisin (Rogiers et al., 2017). De nombreux travaux ont identifiés les canaux shaker comme étant des acteurs essentiels du chargement de la baie en potassium (Cuéllar et al., 2013 ; Nieves-Cordones et al., 2019 ; Villette et al., 2019). Cependant, peu de données sont disponibles sur l'influx de potassium dans les cellules de vacuoles (Hanana et al., 2007). La caractérisation du fonctionnement de systèmes de transport du K^+ tonoplastique comme les TPKs permettrait d'évaluer leur implication dans la régulation du pH vacuolaire.

Afin d'explorer l'hétérogénéité de pH dans l'apoplasme comme suggérée par Martinière et al., 2018 avec deux protéines de fusion à la pHluorine, une ancrée à la membrane plasmique face apoplasmique (PM-Apo) et l'autre sécrétée dans l'espace extracellulaire (Apo), nous avons exploité leurs équivalents fusionnés aux acidines.

L'Acidine 2 nous a permis d'associer les formes PM-Apo et Apo à des valeurs de pH hétérogènes soulignant l'existence de sous domaines de pH au sein de l'espace apoplasmique. En effet, en épiderme de tabac, le pH associé à la forme Apo varie entre 4,5 et 6 alors que le pH enregistré à proximité de la membrane plasmique est très hétérogène et varie principalement entre 3 et 3,5. Les fortes variations de pH dans l'unstirred layer au contact de la membrane plasmique qui ont été enregistrées avec la version PM-Apo-Acidine2 sont associées à un pH plus acide au niveau de la paroi anticlinale en épiderme de tabac et en cotylédon d'Arabidopsis. Dans la pointe racinaire, un profil de pH longitudinal a pu être établit en cohérence avec ce qui est décrit dans la littérature (Staal et al., 2011) avec un pH mesuré avec l'Apo-Acidine2 qui démarre à 5,4 dans la zone de division puis chute graduellement à 5 dans la zone de transition pour atteindre 4,5 dans la zone d'élongation. L'acidification dans les cellules en élongation a été confirmée avec la PM-Apo-Acidine4 qui a permis d'enregistrer des valeurs similaires à ce qui est publié (Barbez et al., 2017) avec un pH de 5,17 dans la zone de transition qui diminue à 4,97 dans les cellules dont la longueur est doublée et se stabilise à 4,68 dans les cellules qui ont fini leur élongation. Enfin, le lien entre croissance et pH a également été souligné par l'alcalinisation du pH apoplasmique générée par l'application de peptide RALF22 qui conduit à l'inhibition de la croissance de la racine primaire.

L'hétérogénéité de pH retrouvée dans l'apoplasme renforcent la pertinence de l'utilisation de biosenseurs génétiquement encodés pouvant être adressés dans des sous-domaines et qui permettent d'obtenir des informations de pH les plus fines possibles. En effet, d'autres outils comme les sondes fluorescentes diffusent au sein de l'espace apoplasmique et ne permettent pas d'apprécier l'hétérogénéité de pH locale.

En épiderme de tabac, les deux formes apoplasmiques des Acidines révèlent une forte hétérogénéité de marquage de l'apoplasme avec une restriction de signal fluorescent au niveau des lobes des cellules avec la forme Apo alors que la PM-Apo donne un signal continu en périphérie des cellules. Ce même type de marquage est retrouvé en racine d'Arabidopsis avec une restriction du signal pour la forme Apo qui s'accumule à l'intersection des cellules et diffuse hors de la racine. Ainsi, la sécrétion des Acidines dans l'espace apoplasmique de

cellules d'épiderme de tabac ou en Arabidopsis n'a permis que l'obtention d'un signal restreint sous forme de poches suggérant une diffusion restreinte des protéines dans l'apoplasme plutôt que l'existence d'un environnement très acide comme suggéré par Martinière et al., 2018. Cette diffusion limitée pourrait s'expliquer par le maillage de la paroi qui empêcherait les protéines de diffuser librement dans l'apoplasme (Carpita et al., 1979). Par ailleurs, la composition de la paroi et plus particulièrement l'état de méthylation des pectines influencerait la diffusion des protéines (Mc Kenna et al., 2019 ; Willats et al., 2001).

Afin d'étendre les zones de l'apoplasme couvertes par les formes PM-Apo et Apo et de palier au problème de diffusion associé aux formes sécrétées, des fusions avec des protéines pariétales : une pectine méthylestérase de lin, la LuPME1 et une protéine de fonction inconnue l'AT5G11420 ont été réalisées. En épiderme de tabac et en Arabidopsis, les fusions pariétales LuPME1mutée et AT5G11420 permettent d'obtenir un marquage plus uniforme que celui obtenu avec la forme Apo. Dans les cellules de la coiffe d'Arabidopsis, un marquage au COS^{647} spécifique des blocs de pectines déméthylées a permis d'apporter des informations supplémentaires sur la localisation des fusions pariétales. Ainsi, on peut penser que les deux fusions pariétales sont associées à des pectines possédant différents degrés de méthylation. Les ratios de fluorescence associés aux fusions pariétales sont également différents avec des ratios plus faibles mesurés par la fusion AT5G11420 suggérant qu'elle se trouve dans un environnement de pH plus acide. En conclusion, il semblerait qu'il y ait également des sous domaines de pH au sein de la paroi. Malheureusement, les fusions pariétales avec la pHluorine n'ont pas permis de mesurer le pH dans la paroi, les ratios de fluorescence observés étant en dessous de la limite de détection minimale du senseur, pH5. L'expression de fusions pariétales avec les Acidines 2 et 4 en épiderme de tabac et en Arabidopsis permettrait d'obtenir des informations sur le gradient de pH qui existe au sein de l'apoplasme entre les formes PM-Apo, Apo et pariétales.

La fusion pariétale avec la pHluorine basée sur la LuPME1 sans mutation du site actif génère d'importants phénotypes au niveau de la racine primaire qui est plus courte. En effet, dans la pointe racinaire, on identifie difficilement la zone de transition qui comprend normalement 5 à 6 cellules dont la vitesse d'élongation est d'abord lente puis augmente. Or dans la lignée LuPME1-pHluorine, les cellules passent directement d'une activité de division à une élongation rapide. De plus, contrairement à une plante sauvage, les poils s'allongent très rapidement et aucun poil de taille intermédiaire n'est détecté. L'élongation rapide de ces cellules semble être reliée à l'activité de la LuPME1 car ce phénomène n'est pas observé avec

la version mutée de la fusion. Ainsi, l'état de méthylation des pectines semblerait avoir une incidence sur l'élongation cellulaire en racine d'Arabidopsis. Par ailleurs, un phénomène inverse est observé dans les poils du mutant pme17-1 pour lequel l'activité totale des PMEs est réduite de 20 % (Sénéchal et al., 2014). Ces données suggèrent qu'un important niveau de pectines déméthylées serait associé à l'élongation des cellules. La surexpression de la LuPME1 diminuerait le niveau de méthylation de pectines de ces cellules et ainsi impacterait les propriétés mécaniques de la paroi et *in fine* l'élongation des cellules. L'activité des PMEs conduit à différents patrons de methylestérification qui s'accompagnent du relargage de méthanol et de protons. Une des conséquences de l'activité des PMEs est une chute locale du pH qui active les protéines pariétales pH dépendantes, favorisant ainsi le relâchement de la paroi (Wolf et Greinier, 2012). La déméthylestérification des pectines permet aussi leur hydratation et leur dégradation par les polygalacturonases contribuant au relâchement de la paroi nécessaire à l'élongation des cellules (Pelloux et al., 2007). En revanche, la déméthylation des pectines en bloc permet leur interaction avec du Ca^{2+} et la formation d'un gel qui rigidifie la paroi qui devient un frein à l'élongation cellulaire (Geitmann et Ortega, 2009). Ainsi, les PMEs jouent un rôle important dans le contrôle des propriétés rhéologiques de la paroi pectinique et impactent directement les propriétés d'expansion cellulaire. Un faible niveau de méthylation des pectines a été associé à un arrêt de la croissance dans l'hypocotyle et le tube pollinique mais aussi dans le poil racinaire (Derbyshire et al., 2007 ; Parre et Geitmann 2005 ; Schoenaers et al., 2018). Néanmoins, la majorité des mutants PMEs ne présentent pas de phénotype de croissance et la présence d'un faible niveau de méthylation des pectines n'est pas systématiquement associée à une rigidification de la paroi comme illustré dans le méristème apical caulinaire et le tube pollinique (Peaucelle et al., 2011). Dans le but d'étudier l'impact de la surexpression de la LuPME1 sur le degré de méthylation de pectines et l'élongation cellulaire, il serait intéressant de déterminer les patrons de déméthylation à l'aide d'anticorps spécifiques, de quantifier la croissance des poils racinaires et d'en étudier les variations de pH pariétal.

La forme caractéristique de pièce de puzzle des cellules d'épiderme dans les cotylédons ou les feuilles dépend de l'hétérogénéité de vitesses de croissance et de propriétés mécaniques de la paroi. En effet, en Arabidopsis, bien que les propriétés de croissance semblent très hétérogènes (vitesse et orientation), la formation des lobes est associée à une expansion rapide des parois périclinales et anticlinales (Elser et al., 2018). De plus, on retrouve une expansion anisotropique au niveau de la paroi périclinale de la face convexe des

lobes alors qu'elle est isotropique au niveau de la face concave (Armour et al., 2015). Pour ajouter encore plus de complexité, des taux d'expansion distincts sont observés entre deux cellules contiguës.

En plus de l'hétérogénéité des propriétés d'expansion de la paroi le long de ces cellules, on retrouve également des propriétés mécaniques de la paroi très variables avec les régions rectilignes qui sont associées à une paroi d'une moindre rigidité comparée aux régions courbes qui forment les lobes (Majda et al., 2017 ; Von Wangenheim et al., 2017). Dans les régions rectilignes, les futurs sites de formation des lobes sont associés entre autre à des pectines faiblement méthylées. Par ailleurs, il existe aussi une hétérogénéité des propriétés mécaniques de la paroi entre deux cellules contiguë avec une paroi plus rigide au niveau de face concave que de la face convexe (Majda et al., 2017). Nos données montrent également une importante hétérogénéité du pH apoplasmique proche de la membrane plasmique avec des pH particulièrement acides au niveau de la paroi anticlinale alors qu'au niveau des lobes, le pH à l'intersection des parois périclinales et anticlinales est moins acide. En racine d'Arabidopsis, un lien clair et fort a déjà été établit entre pH et expansion cellulaire. Néanmoins, on ne dispose pas de données sur les cotylédons. On peut ainsi se demander s'il existe une interconnexion entre les territoires distincts de pH apoplasmique, de croissance et de propriétés mécaniques qui sont observés dans les cellules d'épiderme des cotylédons.

Enfin, dans le contexte du changement climatique, les plantes sont exposées à des perturbations de l'environnement dont la fréquence est croissante. Afin de répondre aux stress (a)biotiques, les plantes doivent les percevoir et y répondre. La paroi est la première barrière des cellules contre les stress environnementaux. Elle est dynamique et des modifications de sa composition ont lieu en réponse à ces stress et sont perçues par les cellules. De nombreuses études soulignent le rôle du métabolisme de la paroi et en particulier des pectines en réponse à un stress (Wan et al., 2021). En général, face à un stress chaud, on observe une diminution du taux de pectines, une augmentation des ramifications latérales et un relâchement de la paroi causé par une augmentation de l'activité des PME (Le Gall et al., 2015 ; Yu et al., 2018). De plus, chez la vigne *Vitis vinifera*, un stress chaud de +8°C conduit à la dérégulation de l'expression de 18 PME dans la baie de raisin (Lecourieux et al., 2017). La modification des pectines semble également être un processus important dans la tolérance au stress salin comme démontré avec la surexpression de la CaPMEI1 (An et al., 2008). Dans le cadre de l'attaque de pathogènes, les pectines sont clivées pour promouvoir l'infection (Bacete et al., 2018). L'intégrité et le remodelage de la paroi générés par ces stress est perçue au niveau de

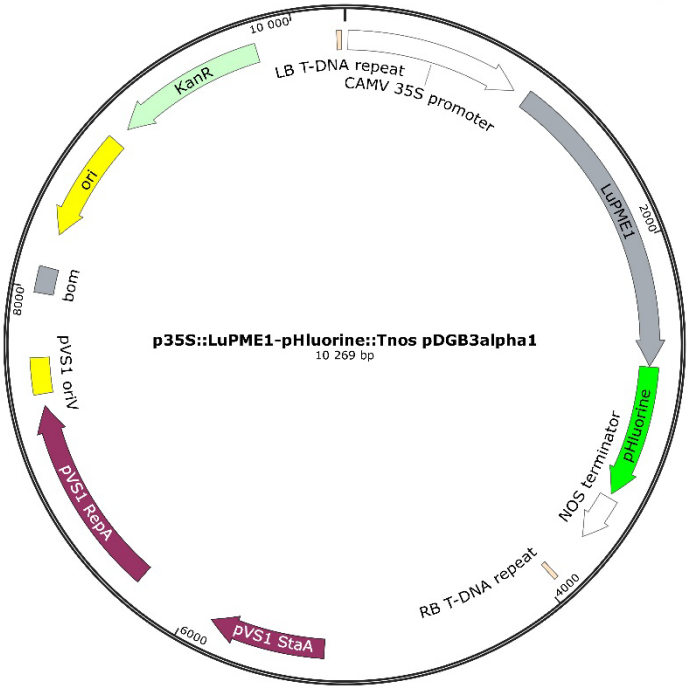
la membrane plasmique par des récepteurs like kinase. Par exemple, les fragments de pectines libérés peuvent interagir avec le récepteur kinase FERONIA et induire une réponse à un stress salin (Feng et al., 2018). FERONIA interagit aussi avec le peptide RALF1 et inhibe l'AHA2 conduisant à une alcalinisation du pH apoplasmique et à une inhibition de la croissance (Haruta et al., 2014). La modification du pH apoplasmique suite à l'inhibition de l'AHA2 joue un rôle important dans la réponse à l'invasion de pathogènes (Masachis et al., 2016 ; Wu et al., 2019). De plus, la modification du pH apoplasmique affecte d'autres acteurs impliqués dans des processus de signalisation comme l'interaction entre RALF34 et son récepteur THESEUS1 ou RALF23 et FERONIA dont les liaisons sont pH dépendantes (Gonneau et al., 2018, Zhang et al., 2020). Les protéines LRX sont aussi des éléments centraux de la réponse à l'intégrité de la paroi et leurs interactions avec les peptides RALF est favorisée dans des conditions pH acides (Fabrice et al., 2018). Ainsi, bien que le pH joue un rôle central dans la perception des stress environnementaux et dans les cascades de signalisation qui en découlent, peu d'informations sont disponibles sur le pH apoplasmique dans ces contextes.

Les Acidines adressées dans l'apoplasme pourraient apporter des informations fines sur les changements de pH *in vivo* dans l'apoplasme en réponse à un stress environnemental. Les formes adressées à la paroi pourraient permettre d'étudier l'impact de la modification du métabolisme pariétal au niveau du pH local et la forme ancrée à la membrane plasmique pourrait permettre d'évaluer l'impact de ces modifications de la paroi sur le pH de l'unstirred layer et sur les liaisons ligands/récepteurs nécessaires à l'élaboration d'une réponse.

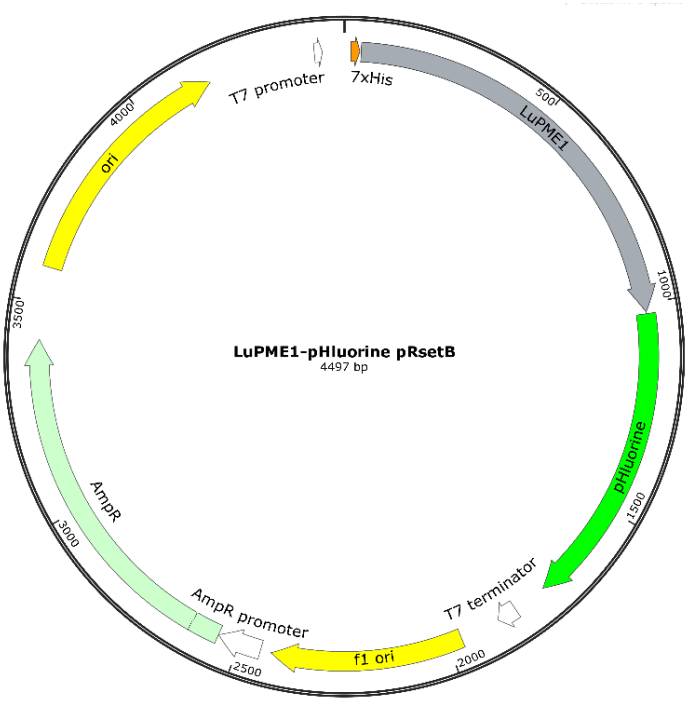
Annexes

5′ggcacccacaaaatctcacttcaaccttcatatccataaggccATGTCGACCTTCTCCCATGCAAC
CACCATTCCCCTTATCTTCGTCCTCCTAATAACCACAACCTCATCAACCCCAACTTCCTCCTCCTCAC
TTCACTTCTCCAAGTCATCTAGAATCATCCTCGTCGAACAAACTCGAAAAAGGGCGCTCTTCGAGGAT
TCGATCATGTCTACCCTGGCCCAAGCTCAGTCGGTCCTCTCCTCCGCGACAGCTCTTGCGATGGCCTC
CACGACACAGCATGATGATGGTCCATCCGATCCATCCGATATTAAAACTGCGGTGGTGGGGCCCACGC
ATGACTGTCTTGACCTCCTGGAGGACACGCTGGAGCAACTCTCAAACGTGGCATACCAAGGACATCAT
GACCCGACCGACGTCCAAACGTGGCTCAGCGCCGCCCTTACCAACCAAGTAACTTGCAAAGAAAGTCT
CCTCCTCACAAAACAATCTCACCATAACAAAGCCACCATACTCCTCGAAACTCTAGCTCACAACATGA
CTCGAACCCTAGGAAACTCTCTAGCTCTGTACGTGAACCATGTCATGAATGACAAATATTATAACTAC
CCTTCTTCTAGTCGTCCGGTCGGTGGAGGAGGCCGGAAGCTGTTATTAACGGAGGACGATAACAAGTT
TCCGGCGTGGCTGCCGGCGGCGAAGAGGAAGCTTCTGGAAGCTTCGGTGGGGGAGCTGGAACCACATG
CCGTGGTGGCGAAGGACGGGAGTGGAACCCACACTAGTATAGCGGAGGCGGTTAGGGATGTGACGGCT
GCGGCGGCGGTCGGAACTATGGCGGGTGGTGGTGGTGGTGGCAGCGGCGTAATATACGTGAAGGCTGG
AACTTATAAGGAAAACCTGAATTTCAAGACGAAACAAAAGAATGTAGTGTTGGTTGGGGACGGAAAGG
GCAAGACCGTCATTGTGGGGAGCAGAAATGCCGACGATGGATCCACCACCTACGACTCCGCCACTGTT
GCCGCAATGGGCGACGGATTCATGGCCAGAGACCTAACGATTGTAAACAGCGCGGGGCCATCAAAGCA
CCAGGCTGTAGCACTCCGGGTTGGATCGGACCGTGCCGTGATATTCCGGTGCTCCATTCAGGGATACC
AGGACACTCTCTACACGCTCTCCAAGCGCCAGTTCTACCGCGAAACCGACATCTATGGCACCGTCGAC
CTCATCTTCGGCAACTCCGCCGTCGTCTTCCAGAACTGCAACATATACACCCGGTCGGGATCCCGCGG
AGACAACTTCATAACCGCCCAGGGTCGGACCGACCCGAACCAGAACACCGGGATCTCCATCCACAACT
GCAGGATTGAATCGGACGGTTCGGGTGCCAAGACCTACCTTGGGAGGCCGTGGAAGGAGTATTCGAGG
ACGGTGGTGATGCAGTCGGTTATCGGAGGCCACGTGGCCTCCGCCGGATGGGCCCCCTGGTCCGGCGG
TTTCGCCCTGAAGACTCTTTACTATGCGGAGTACATGAACTCCGGTCCCGGAGCGGGGATTTCGGGTC
GGTATCGTGGCCGGGGTATAAGGGAGCGGTTGGACCGTTGGAGGCAGGGAAATTTACGGTTGGGCAGT
TGATTGGTGGGAACTCGTGGCTGCCGTCCACCGGAGTGTCGTTTGATGCCGGCTTGATTGGTGTCTAG
ctaatgacgtataaatgacgatgaagattaatacgtacatgtgaataatccgtatacaaacttttac
cttttaattattaaaactacaattaattgcacagtgggaaaataagtaaatgcttatttattgtcact
ttcaaattgtatgatattatttcaagcatctttcaagataagttgtaagtaatgtaaaagatttgttt
gggtcttatgtataattaatgcagtaatgactaatgtatatatgtggcttttacaaaaaaaaaaaaaa
a 3′

Annexe 1 : Séquence de l’ADNc de la *Lupme1* (Al-Qsous et al., 2004).



Annexe 2 : Carte plasmidique de la fusion LuPME1-pHluorine clonée dans le vecteur binaire pDGB3alpha1.



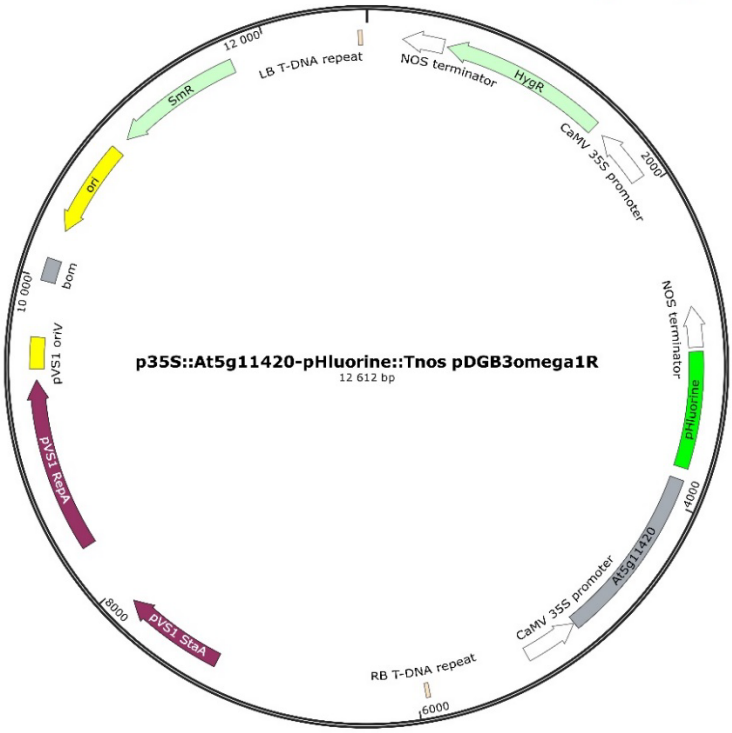
Annexe 3 : Carte plasmidique de la fusion LuPME1-pHluorine clonée dans un vecteur pRsetB d'expression en bactérie.

5' ttttccaagttagacttccatataagctattgctggctcctctcccaatttcccataatttactaaa

tatcactttctagtctcttctctttactttggtcgtccacaATGAAAGGAGGCAGCCTCTCGTTTCTCTT
CGTTCTCCTAATCGCCACCATCACTTCCGTCATTTGCTTCAGTGACGGGATGTTACCAAACGGCGACTTT
GAACTAGGACCAAAACCATCGGACATGAAAGGAACGCAAGTAATAAACAAGAAGGCGATTCCTAGCTGGG
AGCTTTCAGGCTTCGTCGAATACATAAAGTCCGGTCAAAAACAAGGAGACATGCTTCTCGTAGTCCCGGC
CGGAAAGTTCGCAATCCGGCTAGGCAACGAGGCATCGATCAAACAAAGACTTAACGTTACAAAAGGAATG
TATTACTCACTGACGTTCAGTGCCGCAAGGACATGTGCCCAAGACGAACGGCTCAACATATCGGTGGCAC
CTGACTCAGGCGTTATTCCTATACAGACGGTGTACAGTAGCAGTGGATGGGACCTTTACGCATGGGCGTT
CCAAGCCGAGAGTAACGTGGCAGAGATCGTGATTCATAATCCTGGTGAGGAGGAAGATCCTGCTTGTGGA
CCACTCATTGATGGTGTGGCAATCAAAGCTCTATACCCTCCTCGGCCCACCAATAAGAATATATTGAAGA
ACGGAGGATTTGAAGAAGGTCCCTACGTACTCCCAAACGCAACAACCGGCGTTCTGGTTCCTCCCTTTAT
AGAAGATGACCACTCTCCTTTACCCGCGTGGATGGTCGAATCACTCAAAGCCATCAAATACGTTGATGTC
GAGCATTTCTCGGTCCCACAAGGCCGTCGAGCCGTGGAGCTAGTGGCAGGCAAAGAAAGCGCAATCGCTC
AGGTAGCTAGGACCGTTGTGGGAAAAACTTACGTGCTTTCGTTTGCGGTTGGAGATGCTAACAATGCTTG
CCAAGGATCGATGGTGGTCGAGGCATTTGCGGGAAAAGACACTCTAAAGGTACCTTATGAGTCTCGAGGC
AAAGGAGGGTTCAAACGCGCTTCTCTACGGTTTGTGGCGGTTTCGACCCGCACAAGAGTTATGTTTTACA
GCACATTTTACTCGATGAGAAGCGATGATTTCTCATCACTGTGTGGGCCCGTGATCGATGATGTTAAGCT
CCTCAGTGCTCGTAAGCCGTAAgatggccattgttttatttctaaggttcttcgtataagccagtgtggt
Tttttatataaatatgattttcttaatctctaatgcttttgaaatgagatgagtaatactgaaagggtgt
Ttgtggtgtagggttttatataaggcaaaaaggtcttgcttatatatattttcttgtatgagaaggctaa
Agaaatgttgtctgtttttactaaattgggttctttcaaggagatcgggtgattgtgagaataaaaatgt
Aatacagatatatatggtagagaggaatgaggataataatttaactttagcttcttgtgtactaccaatc
Cgtgttaggatcaagcttttctaatcagtttcaaactgaactgccttgaaatccatgttagtagctgaag
caatggctcaaaattttaaaac 3′



Annexe 4 : Séquence du gène At5g11420. A) La séquence du gène At5g11420 comporte trois exons, ce qui est classiquement retrouvé chez les membres de la famille DUF642. Exon 1 en bleu, exon 2 en vert et exon 3 en jaune. B) Représentation schématique du gène At5g11420. Source : eplant bar.toronton



Annexe 5 : Carte plasmidique de la fusion At5t11420-pHluorine. La fusion At5g11420-pHluorine a été clonée dans le vecteur binaire du système Golden Braid pDGB3omega1R compatible pour l'expression en plante.

Milieu/ produit	**Référence**
MS Salt Basal	Duchefa Biochemie M0221.0010
MS Basal medium	Sigma M5519-102
Agar type E	Sigma A4675-1kg
Phytagel	Sigma P8169-100g

Annexe 6 : Liste des produits entrant dans la composition des milieux de culture et leur référence.

Nom de l'amorce	**Séquence 5'-3'**
PME17ox-sens	5' CACCATGATGGCTTTTCGAGCTTATA 3'
PME17ox-antisens	5' GAGACCAGAAGTGAACGGCA 3'
PME17-KO sens	5' CAGCCAAACTCCAAACCCTA 3'
PME17-KO antisens	5' AGATTCGAGACGTTGTTTGACA 3'
FLAG-LB	5' CTACAAATTGCCTTTTCTTATCGAC 3'
CGR2OX sens	5' TTTCATTGCTTCAAAGATGGC 3'
CGR2OX antisens	5' GAGGATGCAGATTCTCACTGC 3'

aha1-6 sens	5' CGTCTCAACAAAAGTCTCTTTCA 3'
aha 1-6 antisens	5' CGAAAGATCAACCTCGTGAGT 3'
aha2-4 sens	5' ATGTTCATTGCAAAGGTGGTG 3'
aha 2-4 antisens	5' CCCATTAGCTCGTGGTTATTG 3'
T-DNA LB	5' TCAAACAGGATTTTCGCCTGCT 3'

Annexe 7 : Liste des amorces utilisées pour le génotypage des mutants aha2.4, cgr2/3 et pme17-1 et des surexpresseurs PME17OX, CGR2OX et CGR3OX.

Valeur de pH	**Composition des tampons utilisés pour la calibration *in vitro/ in situ***	
2,5	Acide acétique 0,1M	glycine
3	Acide acétique 0,1M	Bis-Tris-Propane (BTP) 0,1M
3,5	Acide acétique 0,1M	BTP 0,1M
4	Acide acétique 0,1M	BTP 0,1M
4,5	Acide acétique 0,1M	BTP 0,1M
5	Acide acétique 0,1M	BTP 0,1M
5,5	2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) 0,1M	BTP 0,1M
6	MES 0,1M	BTP 0,1M
6,5	MES 0,1M	BTP 0,1M
7	2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid (HEPES) 0,1M	BTP 0,1M
7,5	HEPES 0,1M	BTP 0,1M
8	HEPES 0,1M	BTP 0,1M
8,5	HEPES 0,1M	BTP 0,1M

Annexe 8 : Composition des tampons utilisés pour calibrer le pH *in vitro* et *in situ*

Pour la calibration *in situ*, les tampons ont été complétés avec 10mM de KCl et 2mM de CaCl2

Valeur de pH	Composition des tampons utilisés pour la calibration *in vivo*
2	MS/2 + glycine-HCl 0,1M
3	MS/2 + glycine-HCl 0,1M
4	MS/2 + MES-KOH 0,1M
5	MS/2 + MES-KOH 0,1M
6	MS/2 + MES-KOH 0,1M
7	MS/2 + HEPES-KOH 0,1M
8	MS/2 + HEPES-KOH 0,1M

Annexe 9 : Composition des tampons utilisés pour calibrer le pH *in vivo*

Références bibliographiques

Abarca, A., Franck, C.M., and Zipfel, C. (2021). Family-wide evaluation of RAPID ALKALINIZATION FACTOR peptides. Plant Physiology *187*, 996–1010.

Aceves-García, P., Álvarez-Buylla, E.R., Garay-Arroyo, A., García-Ponce, B., Muñoz, R., and Sánchez, M. de la P. (2016). Root Architecture Diversity and Meristem Dynamics in Different Populations of Arabidopsis thaliana. Front Plant Sci *7*, 858.

Albenne, C., Canut, H., Hoffmann, L., and Jamet, E. (2014). Plant Cell Wall Proteins: A Large Body of Data, but What about Runaways? Proteomes *2*, 224–242.

Alcaraz-López, C., Botía, M., Alcaraz, C.F., and Riquelme, F. (2005). Induction of fruit calcium assimilation and its influence on the quality of table grapes. Spanish Journal of Agricultural Research *3*.

Allan, D.L., and Jarrell, W.M. (1989). Proton and Copper Adsorption to Maize and Soybean Root Cell Walls. Plant Physiology *89*, 823–832.

Almeida, D., and Huber, D. (2002). Apoplastic pH and inorganic ion levels in tomato fruit: A potential means for regulation of cell wall metabolism during ripening. Physiologia Plantarum *105*, 506–512.

Al-Qsous, S., Carpentier, E., Klein-Eude, D., Burel, C., Mareck, A., Dauchel, H., Gomord, V., and Balangé, A.P. (2004). Identification and isolation of a pectin methylesterase isoform that could be involved in flax cell wall stiffening. Planta *219*, 369–378.

Altartouri, B., Bidhendi, A.J., Tani, T., Suzuki, J., Conrad, C., Chebli, Y., Liu, N., Karunakaran, C., Scarcelli, G., and Geitmann, A. (2019). Pectin Chemistry and Cellulose Crystallinity Govern Pavement Cell Morphogenesis in a Multi-Step Mechanism1 [OPEN]. Plant Physiology *181*, 127–141.

An, S.H., Sohn, K.H., Choi, H.W., Hwang, I.S., Lee, S.C., and Hwang, B.K. (2008). Pepper pectin methylesterase inhibitor protein CaPMEI1 is required for antifungal activity, basal disease resistance and abiotic stress tolerance. Planta *228*, 61–78.

Anderson, C.T., and Kieber, J.J. (2020). Dynamic Construction, Perception, and Remodeling of Plant Cell Walls. Annual Review of Plant Biology *71*, 39–69.

Angelova, M.I., Bitbol, A.-F., Seigneuret, M., Staneva, G., Kodama, A., Sakuma, Y., Kawakatsu, T., Imai, M., and Puff, N. (2018). pH sensing by lipids in membranes: The fundamentals of pH-driven migration, polarization and deformations of lipid bilayer assemblies. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes *1860*, 2042–2063.

Armour, W.J., Barton, D.A., Law, A.M.K., and Overall, R.L. (2015). Differential Growth in Periclinal and Anticlinal Walls during Lobe Formation in Arabidopsis Cotyledon Pavement Cells. Plant Cell *27*, 2484–2500.

Bacete, L., Mélida, H., Miedes, E., and Molina, A. (2018). Plant cell wall-mediated immunity: cell wall changes trigger disease resistance responses. The Plant Journal *93*, 614–636.

Baggiolini M., (1952). Les stades repères dans le développement annuel de la vigne et leur utilisation pratique. Revue romande d'Agriculture et d'Arboriculture 8: 4-6.

Balcerowicz, D., Schoenaers, S., and Vissenberg, K. (2015). Cell Fate Determination and the Switch from Diffuse Growth to Planar Polarity in Arabidopsis Root Epidermal Cells. Frontiers in Plant Science *6*, 1163.

Barbez, E., Dünser, K., Gaidora, A., Lendl, T., and Busch, W. (2017). Auxin steers root cell expansion via apoplastic pH regulation in Arabidopsis thaliana. PNAS *114*, E4884–E4893.

Barnavon, L., Doco, T., Terrier, N., Ageorges, A., Romieu, C., and Pellerin, P. (2001). Involvement of pectin methyl-esterase during the ripening of grape berries: partial cDNA isolation, transcript expression and changes in the degree of methyl-esterification of cell wall pectins. Phytochemistry *58*, 693–701.

Barnuud, N.N., Zerihun, A., Mpelasoka, F., Gibberd, M., and Bates, B. (2014). Responses of grape berry anthocyanin and titratable acidity to the projected climate change across the Western Australian wine regions. Int J Biometeorol *58*, 1279–1293.

Baxter, I., Tchieu, J., Sussman, M.R., Boutry, M., Palmgren, M.G., Gribskov, M., Harper, J.F., and Axelsen, K.B. (2003). Genomic Comparison of P-Type ATPase Ion Pumps in Arabidopsis and Rice. Plant Physiol *132*, 618–628.

Berhin, A., de Bellis, D., Franke, R.B., Buono, R.A., Nowack, M.K., and Nawrath, C. (2019). The Root Cap Cuticle: A Cell Wall Structure for Seedling Establishment and Lateral Root Formation. Cell *176*, 1367-1378.e8.

Bibikova, T.N., Jacob, T., Dahse, I., and Gilroy, S. (1998). Localized changes in apoplastic and cytoplasmic pH are associated with root hair development in Arabidopsis thaliana. Development *125*, 2925–2934.

Bidhendi, A.J., Altartouri, B., Gosselin, F.P., and Geitmann, A. (2019). Mechanical Stress Initiates and Sustains the Morphogenesis of Wavy Leaf Epidermal Cells. Cell Reports *28*, 1237-1250.e6.

Bigard, A., Romieu, C., Sire, Y., and Torregrosa, L. (2020). Vitis vinifera L. Diversity for Cations and Acidity Is Suitable for Breeding Fruits Coping With Climate Warming. Front. Plant Sci. *0*.

Blackburn, M.R., Haruta, M., and Moura, D.S. (2020). Twenty Years of Progress in Physiological and Biochemical Investigation of RALF Peptides1 [OPEN]. Plant Physiology *182*, 1657–1666.

Blumwald, E. (1987). Tonoplast vesicles for the study of ion transport in plant vacuoles. Physiol. Plant. 69:731-734.

Boulton, R. (1980). The general relationship between potassium, sodium and pH in grape juice and wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 31, 182–186.

Bordenave, M. (1996). Analysis of Pectin Methyl Esterases. In Plant Cell Wall Analysis, H.F. Linskens, and J.F. Jackson, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer), pp. 165–180.

Boudart, G., Jamet, E., Rossignol, M., Lafitte, C., Borderies, G., Jauneau, A., Esquerré-Tugayé, M.-T., and Pont-Lezica, R. (2005). Cell wall proteins in apoplastic fluids of

Arabidopsis thaliana rosettes: Identification by mass spectrometry and bioinformatics. PROTEOMICS *5*, 212–221.

Boulton, R. (1980). The relationships between total acidity, titratable acidity and pH in grape tissue. VITIS - Journal of Grapevine Research *19*, 113–113.

Brandizzi, F., Frangne, N., Marc-Martin, S., Hawes, C., Neuhaus, J.-M., and Paris, N. (2002). The Destination for Single-Pass Membrane Proteins Is Influenced Markedly by the Length of the Hydrophobic Domain. Plant Cell *14*, 1077–1092.

Burgstaller, S., Bischof, H., Gensch, T., Stryeck, S., Gottschalk, B., Ramadani-Muja, J., Eroglu, E., Rost, R., Balfanz, S., Baumann, A., et al. (2019). pH-Lemon, a Fluorescent Protein-Based pH Reporter for Acidic Compartments. ACS Sens. *4*, 883–891.

Campbell, L., and Turner, S.R. (2017). A Comprehensive Analysis of RALF Proteins in Green Plants Suggests There Are Two Distinct Functional Groups. Front. Plant Sci. *8*.

Canny, M.J. (1995). Apoplastic Water and Solute Movement: New Rules for an Old Space. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology *46*, 215–236.

Carbonell-Bejerano, P., Santa María, E., Torres-Pérez, R., Royo, C., Lijavetzky, D., Bravo, G., Aguirreolea, J., Sánchez-Díaz, M., Antolín, M.C., and Martínez-Zapater, J.M. (2013). Thermotolerance Responses in Ripening Berries of Vitis vinifera L. cv Muscat Hamburg. Plant and Cell Physiology *54*, 1200–1216.

Cárdenas, L., Lovy-Wheeler, A., Kunkel, J.G., and Hepler, P.K. (2008). Pollen Tube Growth Oscillations and Intracellular Calcium Levels Are Reversibly Modulated by Actin Polymerization. Plant Physiol *146*, 1611–1621.

Carmona, M.J., Chaïb, J., Martínez-Zapater, J.M., and Thomas, M.R. (2008). A molecular genetic perspective of reproductive development in grapevine. Journal of Experimental Botany *59*, 2579–2596.

Emilie Carpentier (2005). EP1 et PME1 : Deux protéines pariétales à motif RGD, quels rôles chez le lin ?, Université de Rouen.

Carpita, N., Sabularse, D., Montezinos, D., and Delmer, D.P. (1979). Determination of the Pore Size of Cell Walls of Living Plant Cells. Science *205*, 1144–1147.

Chatelet, D.S., Rost, T.L., Shackel, K.A., and Matthews, M.A. (2008). The peripheral xylem of grapevine (Vitis vinifera). 1. Structural integrity in post-veraison berries. Journal of Experimental Botany *59*, 1987–1996.

Cho, D., Villiers, F., Kroniewicz, L., Lee, S., Seo, Y.J., Hirschi, K.D., Leonhardt, N., and Kwak, J.M. (2012). Vacuolar CAX1 and CAX3 Influence Auxin Transport in Guard Cells via Regulation of Apoplastic pH. Plant Physiology *160*, 1293–1302.

Ciccarese, A., Stellacci, A.M., Gentilesco, G., and Rubino, P. (2013). Effectiveness of pre- and post-veraison calcium applications to control decay and maintain table grape fruit quality during storage. Postharvest Biology and Technology *75*, 135–141.

Cleland, R. (1963). The Occurrence of Auxin-induced Pectin Methylation in Plant Tissues. Plant Physiol. *38*, 738–740.

Cleland, R.E. (1976). Kinetics of Hormone-induced H+ Excretion 1. Plant Physiology *58*, 210–213.

Conde, C., Silva, P., Fontes, N., Dias, A.C.P., Tavares, R.M., Sousa, M.J., Agasse, A., Delrot, S., and Gerós, H. Biochemical Changes throughout Grape Berry Development and Fruit and Wine Quality. 22.

Cong, B., Liu, J., and Tanksley, S.D. (2002). Natural alleles at a tomato fruit size quantitative trait locus differ by heterochronic regulatory mutations. PNAS *99*, 13606–13611.

Conn, S.J., Gilliham, M., Athman, A., Schreiber, A.W., Baumann, U., Moller, I., Cheng, N.-H., Stancombe, M.A., Hirschi, K.D., Webb, A.A.R., et al. (2011). Cell-Specific Vacuolar Calcium Storage Mediated by CAX1 Regulates Apoplastic Calcium Concentration, Gas Exchange, and Plant Productivity in Arabidopsis. The Plant Cell *23*, 240–257.

Coombe, B.G. (1992). Research on Development and Ripening of the Grape Berry. Am J Enol Vitic. *43*, 101–110.

Coombe, B.G., and McCARTHY, M.G. (2000). Dynamics of grape berry growth and physiology of ripening. Australian Journal of Grape and Wine Research *6*, 131–135.

Cosgrove, D.J. (2005). Growth of the plant cell wall. Nat Rev Mol Cell Biol *6*, 850–861.

Cosgrove, D.J. (2016). Plant cell wall extensibility: connecting plant cell growth with cell wall structure, mechanics, and the action of wall-modifying enzymes. J Exp Bot *67*, 463–476.

Cosgrove, D.J. (2018). Diffuse Growth of Plant Cell Walls. Plant Physiology *176*, 16–27.

Cosgrove, D.J., and Anderson, C.T. (2020). Plant Cell Growth: Do Pectins Drive Lobe Formation in Arabidopsis Pavement Cells? Current Biology *30*, R660–R662.

Costa, C., Graça, A., Fontes, N., Teixeira, M., Gerós, H., and Santos, J.A. (2020). The Interplay between Atmospheric Conditions and Grape Berry Quality Parameters in Portugal. Applied Sciences *10*, 4943.

Cuéllar, T., Azeem, F., Andrianteranagna, M., Pascaud, F., Verdeil, J.-L., Sentenac, H., Zimmermann, S., and Gaillard, I. (2013). Potassium transport in developing fleshy fruits: the grapevine inward K+ channel VvK1.2 is activated by CIPK–CBL complexes and induced in ripening berry flesh cells. The Plant Journal *73*, 1006–1018.

Davies, C., and Boss, P.K. (2000). The use of molecular biology techniques to study and manipulate the grapevine: Why and how? Australian Journal of Grape and Wine Research *6*, 159–167.

Davies, C., Shin, R., Liu, W., Thomas, M.R., and Schachtman, D.P. (2006). Transporters expressed during grape berry (Vitis vinifera L.) development are associated with an increase in berry size and berry potassium accumulation. Journal of Experimental Botany *57*, 3209–3216.

De Angeli, A., Baetz, U., Francisco, R., Zhang, J., Chaves, M.M., and Regalado, A. (2013). The vacuolar channel VvALMT9 mediates malate and tartrate accumulation in berries of Vitis vinifera. Planta *238*, 283–291.

De Smet, S., Cuypers, A., Vangronsveld, J., and Remans, T. (2015). Gene Networks Involved in Hormonal Control of Root Development in Arabidopsis thaliana: A Framework for Studying Its Disturbance by Metal Stress. Int J Mol Sci *16*, 19195–19224.

Demarty, M., Morvan, C., and Thellier, M. (1984). Calcium and the cell wall. Plant, Cell & Environment *7*, 441–448.

Denès, J.-M., Baron, A., Renard, C.M.G.C., Péan, C., and Drilleau, J.-F. (2000). Different action patterns for apple pectin methylesterase at pH 7.0 and 4.5. Carbohydrate Research *327*, 385–393.

Derbyshire, P., McCann, M.C., and Roberts, K. (2007). Restricted cell elongation in Arabidopsishypocotyls is associated with a reduced average pectin esterification level. BMC Plant Biology *7*, 31.

Di Mambro, R., De Ruvo, M., Pacifici, E., Salvi, E., Sozzani, R., Benfey, P.N., Busch, W., Novak, O., Ljung, K., Di Paola, L., et al. (2017). Auxin minimum triggers the developmental switch from cell division to cell differentiation in the *Arabidopsis* root. Proc Natl Acad Sci USA *114*, E7641–E7649.

Diakou, P., and Carde, J.-P. (2001). In situ fixation of grape berries. Protoplasma *218*, 225–235.

DiCiccio, J., and Steinberg, B. (2011). Lysosomal pH and analysis of the counter ion pathways that support acidification. The Journal of General Physiology *137*, 385–390.

Dietrich, P., Sanders, D., and Hedrich, R. (2001). The role of ion channels in light-dependent stomatal opening. Journal of Experimental Botany *52*, 1959–1967.

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

Downey, M.O., Dokoozlian, N.K., and Krstic, M.P. (2006). Cultural Practice and Environmental Impacts on the Flavonoid Composition of Grapes and Wine: A Review of Recent Research. 12.

Droulia, F., and Charalampopoulos, I. (2021). Future Climate Change Impacts on European Viticulture: A Review on Recent Scientific Advances. Atmosphere *12*, 495.

Dubey, S.M., Serre, N.B.C., Oulehlová, D., Vittal, P., and Fendrych, M. (2021). No Time for Transcription—Rapid Auxin Responses in Plants. Cold Spring Harb Perspect Biol *13*, a039891.

Duchêne, É., Dumas, V., Butterlin, G., Jaegli, N., Rustenholz, C., Chauveau, A., Bérard, A., Le Paslier, M.C., Gaillard, I., and Merdinoglu, D. (2020). Genetic variations of acidity in grape berries are controlled by the interplay between organic acids and potassium. Theor Appl Genet *133*, 993–1008.

Eichhorn KW, Lorenz H. (1977). Phaenologische Entwicklungsstadien der Rebe. Nachrichten des deutschen Pflanzen - schutzdienst Deutsche. Weinbau **29**: 119-120.

Elsner, J., Michalski, M., and Kwiatkowska, D. (2012). Spatiotemporal variation of leaf epidermal cell growth: a quantitative analysis of Arabidopsis thaliana wild-type and triple cyclinD3 mutant plants. Annals of Botany *109*, 897–910.

Elsner, J., Lipowczan, M., and Kwiatkowska, D. (2018). Differential growth of pavement cells of Arabidopsis thaliana leaf epidermis as revealed by microbead labeling. American Journal of Botany *105*, 257–265.

Evans, M.L., Ishikawa, H., and Estelle, M.A. (1994). Responses of Arabidopsis roots to auxin studied with high temporal resolution: Comparison of wild type and auxin-response mutants. Planta *194*, 215–222.

Fabrice, T.N., Vogler, H., Draeger, C., Munglani, G., Gupta, S., Herger, A.G., Knox, P., Grossniklaus, U., and Ringli, C. (2018). LRX Proteins Play a Crucial Role in Pollen Grain and Pollen Tube Cell Wall Development. Plant Physiology *176*, 1981–1992.

Fan, H., Dong, H., Xu, C., Liu, J., Hu, B., Ye, J., Mai, G., and Li, H. (2017). Pectin methylesterases contribute the pathogenic differences between races 1 and 4 of Fusarium oxysporum f. sp. cubense. Sci Rep *7*, 13140.

Fasano, J.M., Swanson, S.J., Blancaflor, E.B., Dowd, P.E., Kao, T., and Gilroy, S. (2001). Changes in Root Cap pH Are Required for the Gravity Response of the Arabidopsis Root. The Plant Cell *13*, 907.

Felle, H.H. (1998). The apoplastic pH of the Zea mays root cortex as measured with pH-sensitive microelectrodes: aspects of regulation. Journal of Experimental Botany *49*, 987–995.

Felle, H.H., and Hanstein, S. (2002). The apoplastic pH of the substomatal cavity of Vicia faba leaves and its regulation responding to different stress factors. J Exp Bot *53*, 73–82.

Felle, H.H., Herrmann, A., Hückelhoven, R., and Kogel, K.-H. (2005). Root-to-shoot signalling: apoplastic alkalinization, a general stress response and defence factor in barley (Hordeum vulgare). Protoplasma *227*, 17–24.

Fendrych, M., Leung, J., and Friml, J. (2021). TIR1/AFB-Aux/IAA auxin perception mediates rapid cell wall acidification and growth of Arabidopsis hypocotyls. ELife *5*.

Feng, W., Kita, D., Peaucelle, A., Cartwright, H.N., Doan, V., Duan, Q., Liu, M.-C., Maman, J., Steinhorst, L., Schmitz-Thom, I., et al. (2018). The FERONIA Receptor Kinase Maintains Cell-Wall Integrity during Salt Stress through Ca2+ Signaling. Current Biology *28*, 666-675.e5.

Fernandez, L., Pradal, M., LOPEZ, G., Berud, F., Romieu, C., and Torregrosa, L. (2006). Berry size variability in Vitis vinifera L. Vitis *45*.

Fillion, L., Ageorges, A., Picaud, S., Coutos-Thévenot, P., Lemoine, R., Romieu, C., and Delrot, S. (1999). Cloning and Expression of a Hexose Transporter Gene Expressed during the Ripening of Grape Berry. Plant Physiology *120*, 1083–1093.

Fontes, N., Silva, R., Vignault, C., Lecourieux, F., Gerós, H., and Delrot, S. (2010). Purification and functional characterization of protoplasts and intact vacuoles from grape cells. BMC Res Notes *3*, 19.

Fontes, N., Côrte-Real, M., and Gerós, H. (2011a). New Observations on the Integrity, Structure, and Physiology of Flesh Cells from Fully Ripened Grape Berry. Am. J. Enol. Vitic. *62*, 279–284.

Fontes, N., Gerós, H., and Delrot, S. (2011b). Grape Berry Vacuole: A Complex and Heterogeneous Membrane System Specialized in the Accumulation of Solutes. Am. J. Enol. Vitic. *62*, 270–278.

Fouquet, R., Léon, C., Ollat, N., and Barrieu, F. (2008). Identification of grapevine aquaporins and expression analysis in developing berries. Plant Cell Rep *27*, 1541–1550.

Fuglsang, A.T., Kristensen, A., Cuin, T.A., Schulze, W.X., Persson, J., Thuesen, K.H., Ytting, C.K., Oehlenschlæger, C.B., Mahmood, K., Sondergaard, T.E., et al. (2014). Receptor kinase-mediated control of primary active proton pumping at the plasma membrane. Plant J *80*, 951–964.

Fullerton, C.G., Prakash, R., Ninan, A.S., Atkinson, R.G., Schaffer, R.J., Hallett, I.C., and Schröder, R. (2020). Fruit From Two Kiwifruit Genotypes With Contrasting Softening Rates Show Differences in the Xyloglucan and Pectin Domains of the Cell Wall. Frontiers in Plant Science *11*, 964.

Gao, Y., Fangel, J.U., Willats, W.G.T., Vivier, M.A., and Moore, J.P. (2021). Differences in berry skin and pulp cell wall polysaccharides from ripe and overripe Shiraz grapes evaluated using glycan profiling reveals extensin-rich flesh. Food Chemistry 130180.

Geilfus, C.-M., Mithöfer, A., Ludwig-Müller, J., Zörb, C., and Muehling, K.H. (2015). Chloride-inducible transient apoplastic alkalinizations induce stomata closure by controlling abscisic acid distribution between leaf apoplast and guard cells in salt-stressed Vicia faba. New Phytologist *208*, 803–816.

Geitmann, A., and Ortega, J.K.E. (2009). Mechanics and modeling of plant cell growth. Trends in Plant Science *14*, 467–478.

Geny, L., Ollat, N., and Soyer, J.-P. (1998). Grapevine fruiting cuttings: validation of an experimental system to study grapevine physiology. II. Study of grape development. 1 *32*, 83–90.

Gjetting, S.K., Ytting, C.K., Schulz, A., and Fuglsang, A.T. (2012). Live imaging of intra- and extracellular pH in plants using pHusion, a novel genetically encoded biosensor. Journal of Experimental Botany *63*, 3207–3218.

Gjetting, S.K., Mahmood, K., Shabala, L., Kristensen, A., Shabala, S., Palmgren, M., and Fuglsang, A.T. (2020). Evidence for multiple receptors mediating RALF-triggered Ca2+

signaling and proton pump inhibition. The Plant Journal *104*, 433–446.

Goldberg, R., Morvan, C., Jauneau, A., and Jarvis, M.C. (1996). Methyl-esterification, de-esterification and gelation of pectins in the primary cell wall. In Progress in Biotechnology, J. Visser, and A.G.J. Voragen, eds. (Elsevier), pp. 151–172.

Gonneau, M., Desprez, T., Martin, M., Doblas, V.G., Bacete, L., Miart, F., Sormani, R., Hématy, K., Renou, J., Landrein, B., et al. (2018). Receptor Kinase THESEUS1 Is a Rapid Alkalinization Factor 34 Receptor in Arabidopsis. Current Biology *28*, 2452-2458.e4.

Gouthu, S., and Deluc, L.G. (2015). Timing of ripening initiation in grape berries and its relationship to seed content and pericarp auxin levels. BMC Plant Biology *15*, 46.

Grignon, C., and Sentenac, H. (1991). pH and Ionic Conditions in the Apoplast. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology *42*, 103–128.

Guerra-Guimarães, L., Pinheiro, C., Chaves, I., Barros, D.R., and Ricardo, C.P. (2016). Protein Dynamics in the Plant Extracellular Space. Proteomes *4*, 22.

Haas, K.T., and Peaucelle, A. (2021). From monocots to dicots: the multifold aspect of cell wall expansion. J Exp Bot *72*, 1511–1513.

Haas, K.T., Wightman, R., Meyerowitz, E.M., and Peaucelle, A. (2020). Pectin homogalacturonan nanofilament expansion drives morphogenesis in plant epidermal cells. Science *367*, 1003–1007.

Hager, A. (2003). Role of the plasma membrane H+-ATPase in auxin-induced elongation growth: historical and new aspects. J Plant Res *116*, 483–505.

Hale, C. R. (1977). Relation between potassium and the malate and tartrate contents in grape berries. Vitis 16, 9-19.

Hamann, T. (2012). Plant cell wall integrity maintenance as an essential component of biotic stress response mechanisms. Frontiers in Plant Science *3*, 77.

Hanana, M., Cagnac, O., Yamaguchi, T., Hamdi, S., Ghorbel, A., and Blumwald, E. (2007). A Grape Berry (Vitis vinifera L.) Cation/Proton Antiporter is Associated with Berry Ripening. Plant and Cell Physiology *48*, 804–811.

Hardie, W. j., O'brien, T. p., and Jaudzems, V. g. (1996). Morphology, anatomy and development of the pericarp after anthesis in grape, Vitis vinifera L. Australian Journal of Grape and Wine Research *2*, 97–142.

Haruta, M., Burch, H.L., Nelson, R.B., Barrett-Wilt, G., Kline, K.G., Mohsin, S.B., Young, J.C., Otegui, M.S., and Sussman, M.R. (2010). Molecular Characterization of Mutant Arabidopsis Plants with Reduced Plasma Membrane Proton Pump Activity *. Journal of Biological Chemistry *285*, 17918–17929.

Haruta, M., Sabat, G., Stecker, K., Minkoff, B.B., and Sussman, M.R. (2014). A Peptide Hormone and Its Receptor Protein Kinase Regulate Plant Cell Expansion. Science *343*, 408–411.

Hirsch, R.E., Lewis, B.D., Spalding, E.P., and Sussman, M.R. (1998). A Role for the AKT1 Potassium Channel in Plant Nutrition. Science *280*, 918–921.

Hocq, L., Pelloux, J., and Lefebvre, V. (2017). Connecting Homogalacturonan-Type Pectin Remodeling to Acid Growth. Trends in Plant Science *22*, 20–29.

Hohm, T., Demarsy, E., Quan, C., Allenbach Petrolati, L., Preuten, T., Vernoux, T., Bergmann, S., and Fankhauser, C. (2014). Plasma membrane H+-ATPase regulation is required for auxin gradient formation preceding phototropic growth. Mol Syst Biol *10*, 751.

Houston, K., Tucker, M.R., Chowdhury, J., Shirley, N., and Little, A. (2016). The Plant Cell Wall: A Complex and Dynamic Structure As Revealed by the Responses of Genes under Stress Conditions. Front. Plant Sci. *0*.

Inoue, S., Takahashi, K., Okumura-Noda, H., and Kinoshita, T. (2016). Auxin Influx Carrier AUX1 Confers Acid Resistance for Arabidopsis Root Elongation Through the Regulation of Plasma Membrane H+-ATPase. Plant and Cell Physiology *57*, 2194–2201.

Jenkins, J., Mayans, O., Smith, D., Worboys, K., and Pickersgill, R.W. (2001). Three-dimensional structure of Erwinia chrysanthemi pectin methylesterase reveals a novel esterase active site1 1Edited by J. Thornton. Journal of Molecular Biology *305*, 951–960.

Johansson, K., El-Ahmad, M., Friemann, R., Jörnvall, H., Markovič, O., and Eklund, H. (2002). Crystal structure of plant pectin methylesterase. FEBS Letters *514*, 243–249.

Jolie, R.P., Duvetter, T., Van Loey, A.M., and Hendrickx, M.E. (2010). Pectin methylesterase and its proteinaceous inhibitor: a review. Carbohydrate Research *345*, 2583–2595.

Kanellis, A., and Roubelakis-Angelakis, K. (1993). Grape. In Biochemistry of Fruit Ripening, pp. 189–234.

Keller, M., and Shrestha, P.M. (2014). Solute accumulation differs in the vacuoles and apoplast of ripening grape berries. Planta *239*, 633–642.

Kennedy, J. (2002). Understanding grape berry development. 5.

Kesten, C., Gámez-Arjona, F.M., Menna, A., Scholl, S., Dora, S., Huerta, A.I., Huang, H.-Y., Tintor, N., Kinoshita, T., Rep, M., et al. (2019). Pathogen-induced pH changes regulate the growth-defense balance in plants. The EMBO Journal *38*, e101822.

Kim, S.-J., Held, M.A., Zemelis, S., Wilkerson, C., and Brandizzi, F. (2015). CGR2 and CGR3 have critical overlapping roles in pectin methylesterification and plant growth in Arabidopsis thaliana. The Plant Journal *82*, 208–220.

Kim, T.-H., Böhmer, M., Hu, H., Nishimura, N., and Schroeder, J.I. (2010). Guard Cell Signal Transduction Network: Advances in Understanding Abscisic Acid, CO2, and Ca2+ Signaling. Annu Rev Plant Biol *61*, 561–591.

Kodur, S. (2011). Effects of juice pH and potassium on juice and wine quality, and regulation of potassium in grapevines through rootstocks (*Vitis*): a short review. VITIS - Journal of Grapevine Research *50*, 1–1.

Kramer, E.M., and Bennett, M.J. (2006). Auxin transport: a field in flux. Trends in Plant Science *11*, 382–386.

Kuhn, N., Guan, L., Dai, Z.W., Wu, B.-H., Lauvergeat, V., Gomès, E., Li, S.-H., Godoy, F., Arce-Johnson, P., and Delrot, S. (2014). Berry ripening: recently heard through the grapevine. Journal of Experimental Botany *65*, 4543–4559.

Le Gall, H., Philippe, F., Domon, J.-M., Gillet, F., Pelloux, J., and Rayon, C. (2015). Cell Wall Metabolism in Response to Abiotic Stress. Plants *4*, 112–166.

Lecourieux, F., Kappel, C., Lecourieux, D., Serrano, A., Torres, E., Arce-Johnson, P., and Delrot, S. (2014). An update on sugar transport and signalling in grapevine. Journal of Experimental Botany *65*, 821–832.

Lecourieux, F., Kappel, C., Pieri, P., Charon, J., Pillet, J., Hilbert, G., Renaud, C., Gomès, E., Delrot, S., and Lecourieux, D. (2017). Dissecting the Biochemical and Transcriptomic Effects of a Locally Applied Heat Treatment on Developing Cabernet Sauvignon Grape Berries. Frontiers in Plant Science *8*, 53.

van Leeuwen, C., Friant, P., Choné, X., Tregoat, O., Koundouras, S., and Dubourdieu, D. (2004). Influence of climate, soil, and cultivar on Terroir. American Journal of Enology and Viticulture *55*, 207–217.

Li, Y.-M., Forney, C., Bondada, B., Leng, F., and Xie, Z.-S. (2021). The Molecular Regulation of Carbon Sink Strength in Grapevine (Vitis vinifera L.). Frontiers in Plant Science *11*, 2149.

Lionetti, V., Raiola, A., Camardella, L., Giovane, A., Obel, N., Pauly, M., Favaron, F., Cervone, F., and Bellincampi, D. (2007). Overexpression of pectin methylesterase inhibitors in Arabidopsis restricts fungal infection by Botrytis cinerea. Plant Physiol *143*, 1871–1880.

Lobit, P., Genard, M., Soing, P., and Habib, R. (2006). Modelling malic acid accumulation in fruits: relationships with organic acids, potassium, and temperature. Journal of Experimental Botany *57*, 1471–1483.

Ludevid, D., Höfte, H., Himelblau, E., and Chrispeels, M.J. (1992). The Expression Pattern of the Tonoplast Intrinsic Protein gamma-TIP in Arabidopsis thaliana Is Correlated with Cell Enlargement. Plant Physiol *100*, 1633–1639.

Majda, M., and Robert, S. (2018). The Role of Auxin in Cell Wall Expansion. IJMS *19*, 951.

Majda, M., Grones, P., Sintorn, I.-M., Vain, T., Milani, P., Krupinski, P., Zagórska-Marek, B., Viotti, C., Jönsson, H., Mellerowicz, E.J., et al. (2017). Mechanochemical Polarization of Contiguous Cell Walls Shapes Plant Pavement Cells. Developmental Cell *43*, 290-304.e4.

Mareck, A., Gaffé, J., Morvan, O., Alexandre, C., and Morvan, C. (1995). Characterization of Isoforms of Pectin Methylesterase of Linum usitatissimum Using Polyclonal Antibodies. Plant and Cell Physiology *36*, 409–417.

Markovič, O., and Janeček, Š. (2004). Pectin methylesterases: sequence-structural features and phylogenetic relationships. Carbohydrate Research *339*, 2281–2295.

Martiniere, A., Lavagi, I., Nageswaran, G., Rolfe, D.J., Maneta-Peyret, L., Luu, D.-T., Botchway, S.W., Webb, S.E.D., Mongrand, S., Maurel, C., et al. (2012). Cell wall constrains lateral diffusion of plant plasma-membrane proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences *109*, 12805–12810.

Martinière, A., Bassil, E., Jublanc, E., Alcon, C., Reguera, M., Sentenac, H., Blumwald, E., and Paris, N. (2013a). In Vivo Intracellular pH Measurements in Tobacco and Arabidopsis Reveal an Unexpected pH Gradient in the Endomembrane System. The Plant Cell *25*, 4028–4043.

Martinière, A., Desbrosses, G., Sentenac, H., and Paris, N. (2013b). Development and properties of genetically encoded pH sensors in plants. Front Plant Sci *4*, 523.

Martinière, A., Gibrat, R., Sentenac, H., Dumont, X., Gaillard, I., and Paris, N. (2018). Uncovering pH at both sides of the root plasma membrane interface using noninvasive imaging. PNAS *115*, 6488–6493.

Masachis, S., Segorbe, D., Turrà, D., Leon-Ruiz, M., Fürst, U., El Ghalid, M., Leonard, G., López-Berges, M.S., Richards, T.A., Felix, G., et al. (2016). A fungal pathogen secretes plant alkalinizing peptides to increase infection. Nat Microbiol *1*, 1–9.

McCann, M.C., and Roberts, K. (1994). Changes in cell wall architecture during cell elongation. Journal of Experimental Botany *45*, 1683–1691.

McKenna, J.F., Rolfe, D.J., Webb, S.E.D., Tolmie, A.F., Botchway, S.W., Martin-Fernandez, M.L., Hawes, C., and Runions, J. (2019). The cell wall regulates dynamics and size of plasma-membrane nanodomains in Arabidopsis. PNAS *116*, 12857–12862.

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

Miller, A.J., Cookson, S.J., Smith, S.J., and Wells, D.M. (2001). The use of microelectrodes to investigate compartmentation and the transport of metabolized inorganic ions in plants. Journal of Experimental Botany *52*, 541–549.

Mira de Orduña, R. (2010). Climate change associated effects on grape and wine quality and production. Food Research International *43*, 1844–1855.

Mohnen, D. (2008). Pectin structure and biosynthesis. Current Opinion in Plant Biology *11*, 266–277.

Monshausen, G.B., Bibikova, T.N., Messerli, M.A., Shi, C., and Gilroy, S. (2007). Oscillations in extracellular pH and reactive oxygen species modulate tip growth of Arabidopsis root hairs. PNAS *104*, 20996–21001.

Monshausen, G.B., Bibikova, T.N., Weisenseel, M.H., and Gilroy, S. (2009). Ca2+ Regulates Reactive Oxygen Species Production and pH during Mechanosensing in Arabidopsis Roots. The Plant Cell *21*, 2341–2356.

Morato do Canto, A., Ceciliato, P.H.O., Ribeiro, B., Ortiz Morea, F.A., Franco Garcia, A.A., Silva-Filho, M.C., and Moura, D.S. (2014). Biological activity of nine recombinant AtRALF

peptides: Implications for their perception and function in Arabidopsis. Plant Physiology and Biochemistry *75*, 45–54.

Moreau, H., Zimmermann, S.D., Gaillard, I., and Paris, N. (2021). pH biosensing in the plant apoplast—a focus on root cell elongation. Plant Physiology.

Mravec, J., Kračun, S.K., Rydahl, M.G., Westereng, B., Miart, F., Clausen, M.H., Fangel, J.U., Daugaard, M., Cutsem, P.V., Licht, H.H.D.F., et al. (2014). Tracking developmentally regulated post-synthetic processing of homogalacturonan and chitin using reciprocal oligosaccharide probes. Development *141*, 4841–4850.

Nawrath, C., Schreiber, L., Franke, R.B., Geldner, N., Reina-Pinto, J.J., and Kunst, L. (2013). Apoplastic Diffusion Barriers in Arabidopsis. Arabidopsis Book *11*, e0167.

Nemhauser, J.L., Hong, F., and Chory, J. (2006). Different Plant Hormones Regulate Similar Processes through Largely Nonoverlapping Transcriptional Responses. Cell *126*, 467–475.

Ng, J.K., Schröder, R., Sutherland, P.W., Hallett, I.C., Hall, M.I., Prakash, R., Smith, B.G., Melton, L.D., and Johnston, J.W. (2013). Cell wall structures leading to cultivar differences in softening rates develop early during apple (Malus x domestica) fruit growth. BMC Plant Biol *13*, 183.

Nicolas, P., Lecourieux, D., Gomès, E., Delrot, S., and Lecourieux, F. (2013). The grape berry-specific basic helix–loop–helix transcription factor VvCEB1 affects cell size. Journal of Experimental Botany *64*, 991–1003.

Nieves-Cordones, M., Alemán, F., Martínez, V., and Rubio, F. (2014). K+ uptake in plant roots. The systems involved, their regulation and parallels in other organisms. J Plant Physiol *171*, 688–695.

Nieves-Cordones, M., Andrianteranagna, M., Cuéllar, T., Chérel, I., Gibrat, R., Boeglin, M., Moreau, B., Paris, N., Verdeil, J.-L., Zimmermann, S., et al. (2019). Characterization of the grapevine Shaker K+ channel VvK3.1 supports its function in massive potassium fluxes necessary for berry potassium loading and pulvinus-actuated leaf movements. New Phytol. *222*, 286–300.

Nunan, K.J., Sims, I.M., Bacic, A., Robinson, S.P., and Fincher, G.B. (1998). Changes in Cell Wall Composition during Ripening of Grape Berries. Plant Physiol *118*, 783–792.

Oja, V., Savchenko, G., Jakob, B., and Heber, U. pH and bu□er capacities of apoplastic and cytoplasmic cell compartments in leaves. 11.

Ojeda, H., Deloire, A., Carbonneau, A., Ageorges, A., and Romieu, C. (1999). Berry development of grapevines: Relations between the growth of berries and their DNA content indicate cell multiplication and enlargement. VITIS - Journal of Grapevine Research *38*, 145–145.

Ollat, N., Geny, L., and Soyer, J.-P. (1998). Grapevine fruiting cuttings: validation of an experimental system to study grapevine physiology. I. Main vegetative characteristics. 1 *32*, 1–9.

Ortega-Regules, A., Ros-García, J.M., Bautista-Ortín, A.B., López-Roca, J.M., and Gómez-Plaza, E. (2007). Differences in morphology and composition of skin and pulp cell walls from grapes (Vitis vinifera L.): technological implications. Eur Food Res Technol *227*, 223.

Pacheco-Villalobos, D., Díaz-Moreno, S.M., van der Schuren, A., Tamaki, T., Kang, Y.H., Gujas, B., Novak, O., Jaspert, N., Li, Z., Wolf, S., et al. (2016). The Effects of High Steady State Auxin Levels on Root Cell Elongation in Brachypodium. The Plant Cell *28*, 1009–1024.

Pacifici, E., Polverari, L., and Sabatini, S. (2015). Plant hormone cross-talk: the pivot of root growth. Journal of Experimental Botany *66*, 1113–1121.

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

Pardo, J.M., Cubero, B., Leidi, E.O., and Quintero, F.J. (2006). Alkali cation exchangers: roles in cellular homeostasis and stress tolerance. Journal of Experimental Botany *57*, 1181–1199.

Paris, N., Stanley, C.M., Jones, R.L., and Rogers, J.C. (1996). Plant Cells Contain Two Functionally Distinct Vacuolar Compartments. Cell *85*, 563–572.

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

Pearce, G., Yamaguchi, Y., Munske, G., and Ryan, C.A. (2010). Structure-activity studies of RALF, Rapid Alkalinization Factor, reveal an essential--YISY--motif. Peptides *31*, 1973–1977.

Peaucelle, A., Braybrook, S.A., Le Guillou, L., Bron, E., Kuhlemeier, C., and Höfte, H. (2011). Pectin-Induced Changes in Cell Wall Mechanics Underlie Organ Initiation in Arabidopsis. Current Biology *21*, 1720–1726.

Pelloux, J., Rustérucci, C., and Mellerowicz, E.J. (2007). New insights into pectin methylesterase structure and function. Trends in Plant Science *12*, 267–277.

Perilli, S., and Sabatini, S. (2010). Analysis of Root Meristem Size Development. In Plant Developmental Biology, L. Hennig, and C. Köhler, eds. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 177–187.

Peters, W.S., and Felle, H.H. (1999). The Correlation of Profiles of Surface pH and Elongation Growth in Maize Roots1. Plant Physiology *121*, 905–912.

Petricka, J.J., Winter, C.M., and Benfey, P.N. (2012). Control of Arabidopsis Root Development. Annu Rev Plant Biol *63*, 563–590.

Phyo, P., Wang, T., Xiao, C., Anderson, C.T., and Hong, M. (2017). Effects of Pectin Molecular Weight Changes on the Structure, Dynamics, and Polysaccharide Interactions of Primary Cell Walls of *Arabidopsis thaliana* : Insights from Solid-State NMR. Biomacromolecules *18*, 2937–2950.

Picaud, S., Becq, F., Dédaldéchamp, F., Ageorges, A., and Delrot, S. (2003). Cloning and expression of two plasma membrane aquaporins expressed during the ripening of grape berry. Functional Plant Biol. *30*, 621–630.

Pinzón-Latorre, D., and Deyholos, M.K. (2013). Characterization and transcript profiling of the pectin methylesterase (PME) and pectin methylesterase inhibitor (PMEI) gene families in flax (Linum usitatissimum). BMC Genomics *14*, 742.

Portes, M., Damineli, D., and Feijó, J. (2021). Spatiotemporal Quantification of Cytosolic pH in Arabidopsis Pollen Tubes. BIO-PROTOCOL *11*.

Pyo, Y.J., Gierth, M., Schroeder, J.I., and Cho, M.H. (2010). High-Affinity K+ Transport in Arabidopsis: AtHAK5 and AKT1 Are Vital for Seedling Establishment and Postgermination Growth under Low-Potassium Conditions1[C][W][OA]. Plant Physiol *153*, 863–875.

Rayle, D.L. (1973). Auxin-induced hydrogen-ion secretion in Avena coleoptiles and its implications. Planta *114*, 63–73.

Rayle, D.L., and Cleland, R.E. (1992). The Acid Growth Theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. Plant Physiol *99*, 1271–1274.

Ren, R., Yue, X., Li, J., Xie, S., Guo, S., and Zhang, Z. (2020). Coexpression of Sucrose Synthase and the SWEET Transporter, Which Are Associated With Sugar Hydrolysis and Transport, Respectively, Increases the Hexose Content in Vitis vinifera L. Grape Berries. Frontiers in Plant Science *11*, 321.

Robinson, S.P., and Davies, C. (2000). Molecular biology of grape berry ripening. Australian Journal of Grape and Wine Research *6*, 175–188.

Rogiers, S.Y., Coetzee, Z.A., Walker, R.R., Deloire, A., and Tyerman, S.D. (2017). Potassium in the Grape (Vitis vinifera L.) Berry: Transport and Function. Front. Plant Sci. *8*.

Rongala, J. (2008). Identification and localization of vacuolar organic acid carriers in grapevine berries. Thesis, University of Adelaide, School of Agriculture, Food and Wine, Waite Campus.

Rounds, C.M., Lubeck, E., Hepler, P.K., and Winship, L.J. (2011). Propidium Iodide Competes with Ca2+ to Label Pectin in Pollen Tubes and Arabidopsis Root Hairs1[W][OA]. Plant Physiol *157*, 175–187.

Ruffner, H.P. (1982). Metabolism of tartaric and malic acids in Vitis: a review. B. Vitis.

Ruffner, H.P., and Hawker, J.S. (1977). Control of glycolysis in ripening berries of Vitis vinifera. Phytochemistry *16*, 1171–1175.

Ruffner, H.P., Hawker, J.S., and Hale, C.R. (1976). Temperature and enzymic control of malate metabolism in berries of Vitis vinifera. Phytochemistry *15*, 1877–1880.

Saez-Aguayo, S., Ralet, M.-C., Berger, A., Botran, L., Ropartz, D., Marion-Poll, A., and North, H.M. (2013). PECTIN METHYLESTERASE INHIBITOR6 Promotes Arabidopsis Mucilage Release by Limiting Methylesterification of Homogalacturonan in Seed Coat

Epidermal Cells. Plant Cell *25*, 308–323.

Sakurai, N. (1998a). Dynamic function and regulation of apoplast in the plant body. J. Plant Res. *111*, 133–148.

Sakurai, N. (1998b). Dynamic function and regulation of apoplast in the plant body. J. Plant Res. *111*, 133–148.

Salas-Tovar, J.A., Flores-Gallegos, A.C., Contreras-Esquivel, J.C., Escobedo-García, S., Morlett-Chávez, J.A., and Rodríguez-Herrera, R. (2017). Analytical Methods for Pectin Methylesterase Activity Determination: a Review. Food Anal. Methods *10*, 3634–3646.

Salvi, E., Di Mambro, R., and Sabatini, S. (2020). Dissecting mechanisms in root growth from the transition zone perspective. Journal of Experimental Botany *71*, 2390–2396.

Sattelmacher, B. (2001). The apoplast and its significance for plant mineral nutrition. New Phytologist *149*, 167–192.

Schoenaers, S., Balcerowicz, D., Breen, G., Hill, K., Zdanio, M., Mouille, G., Holman, T.J., Oh, J., Wilson, M.H., Nikonorova, N., et al. (2018). The Auxin-Regulated CrRLK1L Kinase ERULUS Controls Cell Wall Composition during Root Hair Tip Growth. Current Biology *28*, 722-732.e6.

Sénéchal, F., Graff, L., Surcouf, O., Marcelo, P., Rayon, C., Bouton, S., Mareck, A., Mouille, G., Stintzi, A., Höfte, H., et al. (2014). Arabidopsis PECTIN METHYLESTERASE17 is co-expressed with and processed by SBT3.5, a subtilisin-like serine protease. Annals of Botany *114*, 1161–1175.

Sénéchal, F., Mareck, A., Marcelo, P., Lerouge, P., and Pelloux, J. (2015). Arabidopsis PME17 Activity can be Controlled by Pectin Methylesterase Inhibitor4. Plant Signal Behav *10*, e983351.

Shomer, I., Novacky, A.J., Pike, S.M., Yermiyahu, U., and Kinraide, T.B. (2003). Electrical Potentials of Plant Cell Walls in Response to the Ionic Environment. Plant Physiol *133*, 411–422.

Somers, T.C. (1975). In search of quality for red wines. Food Technology in Australia 27, 49–56.

Somers, T.C. (1977). A connection between potassium levels in the harvest and relative quality in Australian red wines. AustralianWine, Brewing and Spirit Review 24, 32–34

Spartz, A.K., Ren, H., Park, M.Y., Grandt, K.N., Lee, S.H., Murphy, A.S., Sussman, M.R., Overvoorde, P.J., and Gray, W.M. (2014). SAUR Inhibition of PP2C-D Phosphatases Activates Plasma Membrane H+-ATPases to Promote Cell Expansion in Arabidopsis[C][W]. Plant Cell *26*, 2129–2142.

Spolaore, S., Trainotti, L., and Casadoro, G. (2001). A simple protocol for transient gene expression in ripe fleshy fruit mediated by Agrobacterium. Journal of Experimental Botany *52*, 845–850.

Staal, M., Cnodder, T.D., Simon, D., Vandenbussche, F., Straeten, D.V.D., Verbelen, J.-P., Elzenga, T., and Vissenberg, K. (2011). Apoplastic Alkalinization Is Instrumental for the Inhibition of Cell Elongation in the Arabidopsis Root by the Ethylene Precursor 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid. Plant Physiology *155*, 2049–2055.

Stephenson, M.B., and Hawes, M.C. (1994). Correlation of Pectin Methylesterase Activity in Root Caps of Pea with Root Border Cell Separation. Plant Physiology *106*, 739–745.

Stoddard, A., and Rolland, V. (2019). I see the light! Fluorescent proteins suitable for cell wall/apoplast targeting in Nicotiana benthamiana leaves. Plant Direct *3*, e00112.

Storey, R. (1987). Potassium localization in the grape berry pericarp by energy-dispersive X-ray microanalysis. *Am. J. Enol. Vitic.* 38, 301–309.

Svolacchia, N., Salvi, E., and Sabatini, S. (2020). Arabidopsis primary root growth: let it grow, can't hold it back anymore! Current Opinion in Plant Biology *57*, 133–141.

Swanson, S.J., Choi, W.-G., Chanoca, A., and Gilroy, S. (2011). In Vivo Imaging of Ca^{2+}, pH, and Reactive Oxygen Species Using Fluorescent Probes in Plants. Annu. Rev. Plant Biol. *62*, 273–297.

Sweetman, C., Deluc, L.G., Cramer, G.R., Ford, C.M., and Soole, K.L. (2009). Regulation of malate metabolism in grape berry and other developing fruits. Phytochemistry *70*, 1329–1344.

Takahashi, K., Hayashi, K., and Kinoshita, T. (2012). Auxin Activates the Plasma Membrane H+-ATPase by Phosphorylation during Hypocotyl Elongation in Arabidopsis. Plant Physiology *159*, 632–641.

Tanida, I., Ueno, T., and Uchiyama, Y. (2014). A super-ecliptic, pHluorin-mKate2, tandem fluorescent protein-tagged human LC3 for the monitoring of mammalian autophagy. PLoS One *9*, e110600.

Tenhaken, R. (2015). Cell wall remodeling under abiotic stress. Frontiers in Plant Science *5*, 771.

Terrier, N., Sauvage, F.-X., Ageorges, A., and Romieu, C. (2001). Changes in acidity and in proton transport at the tonoplast of grape berries during development. Planta *213*, 20–28.

THORNTON, B., and MACKLON, A.E.S. (1989). Copper Uptake by Ryegrass Seedlings; Contribution of Cell Wall Adsorption. Journal of Experimental Botany *40*, 1105–1111.

Tian, G.-W., Chen, M.-H., Zaltsman, A., and Citovsky, V. (2006). Pollen-specific pectin methylesterase involved in pollen tube growth. Developmental Biology *294*, 83–91.

Vaahtera, L., Schulz, J., and Hamann, T. (2019). Cell wall integrity maintenance during plant development and interaction with the environment. Nat. Plants *5*, 924–932.

Velasquez, S.M., Guo, X., Gallemi, M., Aryal, B., Venhuizen, P., Barbez, E., Dünser, K.A., Darino, M., Pěnčík, A., Novák, O., et al. (2021). Xyloglucan Remodeling Defines Auxin-Dependent Differential Tissue Expansion in Plants. International Journal of Molecular Sciences *22*, 9222.

Verbelen, J.-P., De Cnodder, T., Le, J., Vissenberg, K., and Baluška, F. (2006). The Root Apex of Arabidopsis thaliana Consists of Four Distinct Zones of Growth Activities. Plant Signal Behav *1*, 296–304.

Villette, J., Cuéllar, T., Zimmermann, S.D., Verdeil, J.-L., and Gaillard, I. (2019). Unique features of the grapevine VvK5.1 channel support novel functions for outward K+ channels in plants. Journal of Experimental Botany *70*, 6181–6193.

Voxeur, A., and Höfte, H. (2016a). Cell wall integrity signaling in plants: "To grow or not to grow that's the question." Glycobiology *26*, 950–960.

Voxeur, A., and Höfte, H. (2016b). Cell wall integrity signaling in plants: "To grow or not to grow that's the question." Glycobiology *26*, 950–960.

Wakabayashi, K., Hoson, T., and Huber, D.J. (2003). Methyl de-esterification as a major factor regulating the extent of pectin depolymerization during fruit ripening: a comparison of the action of avocado (Persea americana) and tomato (Lycopersicon esculentum) polygalacturonases. Journal of Plant Physiology *160*, 667–673.

Walker, R. r., and Blackmore, D. h. (2012). Potassium concentration and pH inter-relationships in grape juice and wine of Chardonnay and Shiraz from a range of rootstocks in different environments. Australian Journal of Grape and Wine Research *18*, 183–193.

Wan, J., He, M., Hou, Q., Zou, L., Yang, Y., Wei, Y., and Chen, X. (2021). Cell wall associated immunity in plants. Stress Biology *1*, 3.

von Wangenheim, D., Wells, D.M., and Bennett, M.J. (2017). Adding a Piece to the Leaf Epidermal Cell Shape Puzzle. Developmental Cell *43*, 255–256.

Weiller, F., Schückel, J., Willats, W.G.T., Driouich, A., Vivier, M.A., and Moore, J.P. (2021). Tracking cell wall changes in wine and table grapes undergoing Botrytis cinerea infection using glycan microarrays. Annals of Botany.

Wen, F., Zhu, Y., and Hawes, M.C. (1999). Effect of Pectin Methylesterase Gene Expression on Pea Root Development. The Plant Cell *11*, 1129–1140.

Willats, W.G.T., Orfila, C., Limberg, G., Buchholt, H.C., van Alebeek, G.-J.W.M., Voragen, A.G.., Marcus, S.E., Christensen, T.M.I.E., Mikkelsen, J.D., Murray, B.S., et al. (2001). Modulation of the Degree and Pattern of Methyl-esterification of Pectic Homogalacturonan in Plant Cell Walls: IMPLICATIONS FOR PECTIN METHYL ESTERASE ACTION, MATRIX PROPERTIES, AND CELL ADHESION*. Journal of Biological Chemistry *276*, 19404–19413.

Wolf, S., and Greiner, S. (2012). Growth control by cell wall pectins. Protoplasma *249*, 169–175.

Wolf, S., and Höfte, H. (2014). Growth Control: A Saga of Cell Walls, ROS, and Peptide Receptors. Plant Cell *26*, 1848–1856.

Wolf, S., Mouille, G., and Pelloux, J. (2009). Homogalacturonan Methyl-Esterification and

Plant Development. Molecular Plant *2*, 851–860.

Wolf, S., Mravec, J., Greiner, S., Mouille, G., and Höfte, H. (2012). Plant Cell Wall Homeostasis Is Mediated by Brassinosteroid Feedback Signaling. Current Biology *22*, 1732–1737.

Wu, H.-C., Bulgakov, V.P., and Jinn, T.-L. (2018). Pectin Methylesterases: Cell Wall Remodeling Proteins Are Required for Plant Response to Heat Stress. Frontiers in Plant Science *9*, 1612.

Xiao, C., Somerville, C., and Anderson, C.T. (2014). POLYGALACTURONASE INVOLVED IN EXPANSION1 Functions in Cell Elongation and Flower Development in *Arabidopsis*. Plant Cell *26*, 1018–1035.

Xue, C., Guan, S.-C., Chen, J.-Q., Wen, C.-J., Cai, J.-F., and Chen, X. (2020). Genome wide identification and functional characterization of strawberry pectin methylesterases related to fruit softening. BMC Plant Biol *20*, 13.

Young, J.C., DeWitt, N.D., and Sussman, M.R. (1998). A Transgene Encoding a Plasma Membrane H+-ATPase That Confers Acid Resistance in Arabidopsis thaliana Seedlings. Genetics *149*, 501–507.

Yu, K., Liu, Y., Tichelaar, R., Savant, N., Lagendijk, E., van Kuijk, S.J.L., Stringlis, I.A., van Dijken, A.J.H., Pieterse, C.M.J., Bakker, P.A.H.M., et al. (2019). Rhizosphere-Associated Pseudomonas Suppress Local Root Immune Responses by Gluconic Acid-Mediated Lowering of Environmental pH. Current Biology *29*, 3913-3920.e4.

Yu, Q., Tang, C., and Kuo, J. A critical review on methods to measure apoplastic pH in plants. 12.

Zeng, L., Wang, Z., Vainstein, A., Chen, S., and Ma, H. (2011). Cloning, Localization, and Expression Analysis of a New Tonoplast Monosaccharide Transporter from Vitis vinifera L. J Plant Growth Regul *30*, 199–212.

Zhang, B., Gao, Y., Zhang, L., and Zhou, Y. (2021). The plant cell wall: Biosynthesis, construction, and functions. Journal of Integrative Plant Biology *63*, 251–272.

Zhang, X., Yang, Z., Wu, D., and Yu, F. (2020). RALF–FERONIA Signaling: Linking Plant Immune Response with Cell Growth. Plant Communications *1*, 100084.

Zhang, Z., Zou, L., Ren, C., Ren, F., Wang, Y., Fan, P., Li, S., and Liang, Z. (2019). VvSWEET10 Mediates Sugar Accumulation in Grapes. 18.

Zuch, D.T., Doyle, S.M., Majda, M., Smith, R.S., Robert, S., and Torii, K.U. (2021). Cell biology of the leaf epidermis: Fate specification, morphogenesis and coordination. The Plant Cell.

Zuniga, E., and Buen, A. (2012). The two DUF642 At5g11420 and At4g32460-encoded proteins interact in vitro with the AtPME3 catalytic domain. Protein Interactions 119–142.

Zúñiga-Sánchez, E., Soriano, D., Martínez-Barajas, E., Orozco-Segovia, A., and

Gamboa-deBuen, A. (2014). BIIDXI, the At4g32460 DUF642 gene, is involved in pectin methyl esterase regulation during Arabidopsis thalianaseed germination and plant development. BMC Plant Biology *14*, 338.

La vigne est une des espèces à fruits charnus ayant le plus fort impact socio-économique dans le monde. Ses fruits, les raisins, servent majoritairement à l'élaboration de vin. Au cours du développement, les raisins accumulent eau, sucres, acides organiques, composés phénoliques et précurseurs aromatiques qui déterminent la qualité au moment du vendage. Un des marqueurs de qualité des raisins est l'acidité de la baie qui augmente de pH2,5 à pH3,5 au cours de son développement. Cette acidité résulte essentiellement d'un équilibre entre les acides organiques vacuolaires et leur contre ion majoritaire, le potassium. Le pH de l'apoplasme qui joue un rôle fondamental dans la croissance cellulaire, influence aussi les systèmes de transport membranaire qui contrôlent le chargement de la baie. Dans le contexte actuel de changement climatique, la qualité des vins est menacée. En effet, l'augmentation des températures conduit à une chute de l'acidité et à une accumulation excessive de potassium qui, à terme, impactent fortement et négativement la qualité des vins. Dans ces conditions, l'étude du pH des baies de raisin au niveau cellulaire au cours du développement est primordiale et participerait à apporter des connaissances sur les mécanismes qui gouvernent l'acidité des raisins. L'objectif principal de ma thèse était d'analyser la distribution des protons à l'échelle cellulaire dans la vacuole et l'apoplasme où le pH est très acide. Mon travail s'est donc concentré sur l'exploration des sondes chimiques disponibles et sur le développement de senseurs de pH génétiquement encodés qui sont adaptés au pH acide : les Acidines. Ces approches ont permis de mesurer le pH dans la vacuole des baies de raisin au cours de son développement. De plus, grâce à des signaux d'adressage spécifiques, les Acidines ont été adressées à différents domaines de l'apoplasme, soit par ancrage à la membrane plasmique, soit par sécrétion. En épiderme de tabac et en Arabidopsis, ces fusions apoplasmiques ont permis de mettre en évidence la présence de sous domaines de pH. Pour étendre la couverture de l'apoplasme explorée par ces senseurs de pH, nous les avons fusionnés à deux protéines pariétales dont la pectine methylestérase de lin LuPME1. Les résultats préliminaires de caractérisation de l'ensemble de ces fusions ont permis de suggérer un lien entre l'état de méthylation des pectines et le pH apoplasmique. Ces nouveaux senseurs apoplasmiques ouvrent des perspectives intéressantes pour étudier l'élongation cellulaire en relation avec des variations de pH à l'échelle subcellulaire autant que la régulation par le pH des échanges ioniques à la membrane plasmique.

Grapevine is one of the fleshy fruit species with the greatest socio-economic impact in the world. Its fruits, the grape berries, are mainly used for wine production. During development, grape berries accumulate water, sugars, organic acids, phenolic compounds and aromatic precursors which determine the quality at the harvest time. One of the quality markers of grapes is the acidity of the berry, which increases from pH2.5 to pH3.5 during development. This acidity results essentially from a balance between the vacuolar organic acids and their major counterion, potassium. The pH of the apoplast which plays a fundamental role in cell growth, also influences the membrane transport systems which control the loading of the berry. In the current context of climate change, the quality of wines is threatened. Indeed, the increase in temperatures leads to a drop in acidity and an excessive accumulation of potassium which at the end, strongly and negatively impacts the quality of the wines. Under these conditions, the study of the grape berries pH at the cellular level during development is essential and would help to provide knowledge on the mechanisms governing the acidity of grape berries. The main objective of my thesis was to analyze the distribution of protons at the cellular level in the vacuole and the apoplast where the pH is very acidic. My work therefore focused on the exploration of available chemical probes and on the development of genetically encoded pH sensors that are adapted to acidic pH: the Acidins. These approaches made it possible to measure the pH in the grape berry vacuole during its development. In addition, thanks to specific targeting signals, the Acidins were adressed to different apoplastic subdomains, either by anchoring to the plasma membrane or by secretion. In tobacco epidermis and in Arabidopsis, these apoplastic fusions made it possible to highlight the presence of pH subdomains. To extend the coverage of the apoplast explored by these pH sensors, we fused them to two cell wall proteins, including the flax pectin methylesterase LuPME1. Our preliminary results for these fusions suggested a link between the methylation degree of pectins and the apoplastic pH. These new apoplastic sensors open interesting perspectives for studying cell elongation in relation with pH variations at the subcellular scale as well as for the role of pH in regulating ionic exchanges at the plasma membrane.