Thèse de Doctorat

Discipline - Biologie
Spécialité – Biochimie, biologie et physiologie cellulaire et moléculaire

présentée à l'Ecole Doctorale en Sciences, Technologie, Santé (ED 585)

de l'Université de Picardie Jules Verne

par

Maxime ROUFFLE

Caractérisation biochimique et fonctionnelle de polygalacturonases (PG) chez *Physcomitrium patens*.

Biochemical and functional characterization of polygalacturonases (PG) in *Physcomitrium patens*.

Soutenue le 30 mars 2026, après avis des rapporteurs, devant le jury d'examen :

Mme. PAU-ROBLOT Corinne, Professeure, Université de Picardie Jules Verne	Président du jury
Mr. PALAUQUI Jean-Christophe, Chargé de recherche, INRAE AgroParisTech - IJPB	Rapporteur
Mme. FOLLET GUEYE Marie-Laure, Maître de Conférences HDR, Université de Rouen Normandie	Rapporteur
Mme. BONHOMME Sandrine, Directrice de recherche, INRAE AgroParisTech - IJPB	Examinateur
Mr. ROPITAUX Marc, Maître de Conférences, Université de Rouen Normandie	Examinateur
Mr. PELLOUX Jérôme, Professeur, Université de Picardie Jules Verne	Directeur de thèse
Mme. LEFEBVRE Valérie, Maître de Conférences, Université de Picardie Jules Verne	Co-encadrant
Mr. TEH Ooi-Kock, Assistant research fellow, Institute of Plant and Microbial Biology, Academia Sinica, Taiwan	Invité

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à adresser mes remerciements à l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Je remercie **Marie Laure FOLLET-GEYE** et **Jean-Christophe PALAUQUI**, rapportrice et rapporteur de mon manuscrit. Merci également à **Sandrine BONHOMME**, **Corinne PAU-ROBLOT** et **Marc ROPITAUX**, les examinatrices et examinateur.

Je tiens ensuite à remercier mes directeurs de thèse, **Valérie LEFEBVRE** et **Jérôme PELLOUX**. Merci de m'avoir offert l'opportunité de travailler au sein de la Pecteam BIOPI, puis de m'avoir fait confiance lors de ma candidature à ce projet de thèse. Je vous remercie pour votre encadrement rigoureux, vos conseils, votre patience et votre curiosité scientifique. Merci pour votre accompagnement durant cette riche expérience qui m'a permis de développer mes connaissances et mes compétences, ainsi que de grandir aussi bien scientifiquement que personnellement.

Je souhaite également remercier les membres de mon CSI pour m'avoir suivi et conseillé durant ces trois années de thèse. Merci à **Sandrine BONHOMME**, **Jean-Claude MOLLET** et **Eric HUSSON** pour vos conseils avisés et votre bienveillance.

Merci à l'équipe du CRRBM, **Laurent GUTIERREZ**, **Stéphanie GUENIN**, **Gaëlle MONGELARD**, **Emilie JACOB** et **Hervé DEMAILLY**, pour votre aide et votre disponibilité durant toutes ces années. Merci notamment à Stéphanie pour m'avoir formé sur l'usage des macroscopes qui s'est avéré plus qu'utile durant mes nombreuses expériences. Merci également à l'équipe de la plateforme analytique **Serge PILARD**, **Dominique CAILLEU** et **David MATHIRON** pour votre aide sur la LC/MS. Ainsi qu'à **Aline VOXEUR** pour son travail remarquable sur les bases de données d'oligoprofilage. Je remercie également **Caroline HADAD** du LG2A pour son aide sur la FTIR.

Je tiens ensuite à grandement remercier **Sandrine BONHOMME**, une nouvelle fois, ainsi que l'équipe de l'IJPB de l'INRAE de Versailles. Merci de m'avoir tout appris sur le modèle *Physcomitrium patens*, sa culture et sa transformation. Merci également pour tes très nombreux conseils, ton aide et ta gentillesse. Merci beaucoup à toute l'équipe pour son chaleureux accueil et sa bienveillance.

Je passe un instant dans la langue de Shakespeare pour remercier l'équipe de Taïwan. I would like to express my sincere gratitute to **Ooi-Kock TEH** for welcoming me into his team at the IPMB of Academia Sinica in Taipei. Thank you for all your advice, your good humor and your help with the transformations. I would also like to thank you for accepting the invitation to attend my thesis defense. Next, I would like to thank **Manju**, who recently started her own PhD adventure, for her attitude and sunny personality. Thank you for taking the time to introduce me to some of Taiwanese culture and for proudly sharing your Newah culture. Thank you for your good mood, which helped me stay on track so far from home. Good luck with your thesis! Then, I would also like to thank **Bal**, the team's post-doc, for your help and advice. Thank you also for your time, your friendly and warm personality, and for introducing me to traditional Indian cuisine. Please give my regards to your wife. I wish you all the best! Finally, I must not forget to thank **Eva** and **Leo** for their help and for sharing their culture. I will never forget our wonderful day of tourism in some of the most beautiful places outside Taipei. Thank you for these wonderful moments and memories, and thank you for your unforgettable hospitality. Good luck for the future! Thanks also to all the young interns who lit up the lab with their cheerful energy! Thank you all for this experience.

Je me dois bien évidemment de remercier l'ensemble de l'équipe de BIOPI. Tout d'abord, **François MESNARD**, le directeur du laboratoire. Merci à **Corinne**, **Christine**, **Catherine**, **Karine**, **Sophie et Véronique**, puis à **Jean-Marc**, **Olivier**, **Fabien** et **Josip**. Merci à tous pour votre soutien durant toutes ces années. Je souhaite notammment remercier **François JOBERT** pour son aide sur l'immunohistochimie et le phénotypage des protoplastes régénérants, mais aussi pour ses bons conseils et sa curiosité scientifique. **Romain ROULARD** pour son aide sur l'identification des monosaccharides de la paroi de *Physcomitrium* par HPAEC, ainsi que pour nos longues conversations sur divers sujets pour refaire le monde autour d'un café. **Camille CARTON** pour son aide sur la suite des manipulations, sur l'analyse des mutants et sur l'application de PP60, mais aussi pour sa gentillesse et son tempérament solaire qui met l'ambiance au labo.

Merci aussi à **Clémence ALLARD** pour son aide sur les analyses de données FTIR, ainsi que pour sa maîtrise du logiciel Word sans laquelle ce document ne serait pas ce qu'il est aujourd'hui. Clémence, je te remercie également d'avoir égayé notre bureau avec nos rires, nos mimiques et nos délires. Merci d'avoir rendu ce travail de rédaction un peu plus supportable et d'apporter de la lumière dans cette pièce pourtant bien sombre, tout comme dans nos vies. Mais aussi **Romain BRIATTE**, second camarade de bureau, toujours prêt à accompagner nos discussions ou à accentuer nos remarques par une pointe d'humour lorsqu'il n'est pas en train de performer à la paillasse, ainsi que pour son aide pour la caractérisation biochimique de PpPG4. Je remercie aussi **Marie**, dernière arrivante et personnification du calme et de la douceur dans le bureau. Je te souhaite le meilleur pour le petit être qui est arrivé récemment dans ta vie. Et bon courage ! Ma place au sein de ce bureau va me manquer, mais je sais qu'elle ne restera pas froide très longtemps. N'est-ce pas **Tangi** ? Je te remercie toi aussi pour nos quelques conversations, toi qui viens d'arriver en thèse, et te souhaite beaucoup de courage ! Tout comme je souhaite du courage à **Chloé**, ex-stagiaire du premier étage, qui est passée au niveau supérieur, au sens propre comme au sens figuré. Merci de m'avoir soutenu durant ces longs derniers mois et merci de m'avoir donné envie de me remettre à jouer de la musique. Puisses-tu toujours être heureuse en sciences, en musique et en paléontologie ! Je souhaite également bon courage aux autres nouveaux doctorants **Camille N.** et **Lara**, ainsi qu'aux autres arrivants, **Hasan**, **Rifat** et **Nadia**. Je tiens à remercier également **Juliette**, collègue des horaires tardifs, pour nos conversations, nos plaintes et nos plaisanteries avec un humour parfois douteux. Essaie de ne pas rester trop tard au labo et prends soin de toi. Tu travailles trop ! Je remercie aussi **Mihaela** qui, même si elle m'utilise surtout pour travailler son français, fait toujours preuve d'une grande gentillesse et de finesse. Sauf quand il s'agit de se moquer de moi et de ma soi-disant aigreur… Moi, aigri ? Je n'oublie pas… En attendant, je vous souhaite, à toutes les deux, bon courage pour la fin de vos thèses respectives, et bonne chance pour la suite ! Sretno i sve najbolje ! Je remercie également les stagiaires m'ayant aidé dans le déroulement de cette thèse, **Vanille**, **Daniel** et **Anamarija**. Je vous souhaite le meilleur pour la suite ! Enfin, je tiens à remercier **Adrien**, le meilleur d'entre nous tous. Celui qui nous a tout appris mais qui, malgré cela, fait preuve d'une grande humilité et a toujours un mot gentil pour remonter le moral. Pour finir, je ne peux pas parler de BIOPI, sans parler de **Solène**. Merci d'avoir été là et de m'avoir aidé de nombreuses fois, de m'avoir formé au tout début de mon arrivée au laboratoire et de t'être soucié de mon état de fatigue plus souvent que moi. Merci pour ta personnalité et ton rire communicatif. Vous allez tous me manquer. Mais je garderai toujours de bons souvenirs de cette belle équipe. A bientôt !

Le travail effectué durant ces trois longues années n'aurait pas pu être possible sans le soutien indéfectible de mes amis les plus proches. Je pense bien évidemment en premier lieu au **Dr. Pauline TREZEL**, toi qui m'as recommandé pour un poste au sein de BIOPI. Toi que j'ai vu évoluer, grandir, chuter, te relever, te faire bousculer par la vie mais toujours avancer. Tu peux être fière de toi, car je suis fier d'être ton ami et je te suis reconnaissant pour tous tes mots, tes conseils et ton soutien. Je regrette simplement de ne pas être ton ex-collègue préféré puisque **Jonathan** occupe ce rôle… Blague à part, merci à toi aussi Jo pour ton soutien sans faille. Je tiens également à remercier **Marine**, car même si beaucoup de choses ont changé, tu as été la première à me soutenir dans mon projet de faire une thèse, et ce n'est que justice que de te rendre cet honneur. Je souhaite également remercier **Eliane** et **Quentin**. Merci pour vos mots et pour votre patience. Vous êtes deux très belles personnes et j'avoue ici être fier de compter des naturalistes parmi mes amis. La nature est belle, et vous la représentez très bien. Je remercie ensuite **Louis** et **Noémie**, même si nous avons beaucoup de soirées jeux de société à rattraper, vous êtes toujours restés derrière moi pour m'encourager. Même si vous avez traversé des moments difficiles, sachez que je suis moi aussi derrière vous et vous souhaite le meilleur avenir possible. Enfin, je tiens à remercier particulièrement chaleureusement, sans modestie, et non pas parce que je sais qu'elle attend ce passage avec impatience, **Malorie**. Merci de m'avoir sorti de mon isolement, que dis-je, de ma grotte bien des fois. Mais également, merci de m'avoir soutenu plus que de raison et de m'avoir encouragé sans interruption du début à la fin. Tu es une très belle personne et je te souhaite le meilleur, en espérant entendre encore tes multiples péripéties et mésaventures autour d'un verre. A très vite !

Je tiens bien sûr à remercier **Manon**, rencontrée ici à BIOPI, pour son soutien sans faille, tous ses mots et ses nombreux encouragements. Je te remercie d'apporter de la douceur et des rires à ma vie, ainsi que d'être ce petit rayon de soleil, toujours souriante et pétillante de joie. Je te souhaite le meilleur dans toute ta vie, et je te soutiendrai comme tu l'as fait.

Pour conclure, je tiens absolument à remercier ma famille. En commençant par **ma mère**, que j'aime, qui a toujours tout fait pour que je ne manque de rien. Puis **mon père**, que j'aime, pour ses conseils et pour sa persévérance dont j'ai visiblement hérité. Je remercie **Murielle** de prendre soin de lui. Puis je remercie bien évidemment les trois petits anges **Elise**, **Noa** et **Mia** d'être là, simplement, ajoutant de la vie à notre belle famille. Enfin, je remercie **Nicolas** et **Aurélien**, et biensûr, mes deux sœurs, **Amélie** et **Estelle**, que j'aime et que je respecte plus que je ne saurai jamais le dire. Merci à ma famille pour leurs encouragements.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS ..... **I**
ABREVIATIONS ..... **XVII**
LISTE DES FIGURES ..... **XXV**
LISTE DES TABLEAUX ..... **XXXIII**
RESUME ..... **XXXV**
PREAMBULE **2**
INTRODUCTION **4**
CHAPITRE I : ROLES ET COMPOSITION DE LA PAROI CELLULAIRE VEGETALE **4**
I.1. La paroi cellulaire végétale 4
I.2. Organisation 6
I.3. Rôles et fonctions de la paroi primaire 10
I.4. Composition de la paroi primaire 12
I.4.1. La cellulose 12
I.4.2. Les hémicelluloses 14
I.4.3. Les protéines pariétales 18
I.4.3.1. Les expansines 18
I.4.3.2. Les extensines 18
I.4.3.3. Les AGPs 20
I.4.3.4. Les XTHs 20
I.4.3.5. Les récepteurs 22
I.4.4. Les pectines 26
I.4.4.1. Généralités 26
I.4.4.3. Les Homogalacturonanes (HGs) 32
I.4.4.4. Les Rhamnogalacturonanes de type I (RG-I) 34
I.4.4.5. Les Rhamnogalacturonanes de type II (RG-II) 36
I.4.4.6. Les Xylogalacturonanes (XG) 40
CHAPITRE II : LE REMODELAGE DES PECTINES **42**
II.1. Le remodelage des RG-I, RG-II et XG 42
II.2. Le remodelage des HGs 46
II.2.1. Les pectine méthylestérases (PME) 48
II.2.2. Les pectine acétylestérases (PAE) 56

II.2.3. Les pectate/pectine lyases (PL/PNL) 62
II.2.4. Les polygalacturonases (PG) 70
II.2.4.1. Structure des PGs 70
II.2.4.2. Mode d'action des PGs 72
II.2.4.3. Régulation de l'activité des PGs 76
II.2.4.4. Rôle des PGs dans le développement 78
CHAPITRE III : LA PAROI DE *PHYSCOMITRIUM PATENS* 84
III.1. Présentation de *Physcomitrium patens* 84
III.1.1. Histoire du modèle 84
III.1.2. Systématique et taxonomie 86
III.1.3. Écologie et géographie 88
III.1.4. Génétique et génomique 88
III.1.5. Morphologie et développement 90
III.2. Organisme modèle du développement cellulaire 94
III.3. La paroi cellulaire de *Physcomitrium patens* 102
III.3.1. Biosynthèse et facteurs de régulation 106
III.3.2. Rôle de la paroi dans le développement cellulaire de *P. patens* 110
III.3.3. Les enzymes de remodelage des pectines chez *P. patens* 112
OBJECTIFS DE LA THESE 116
RESULTATS 120
CHAPITRE I : IMPACT DE LA STRUCTURE DES HG SUR LE DEVELOPPEMENT DE *Physcomitrium patens* 120
I.1. Phénotypage de *P. patens* sauvage et application exogène de PP60 120
I.1.1. Phénotypage de la croissance bidimensionnelle de *P. patens* avec ou sans PP60 120
I.1.3. Phénotypage des caulonémas agravitropiques de *P. patens* avec ou sans PP60 124
I.2. Étude de la composition de la paroi de *P. patens* par immunomarquage 126
CHAPITRE II : LES POLYGALACTURONASES PpPG2 ET PpPG3 130
II.1. Les polygalacturonases de *Physcomitrium patens* 130
II.2. Analyses structurales de PpPG2 et PpPG3 132
II.3. Production et caractérisation biochimique de PpPG2 et PpPG3 140
II.3.1. Production et purification 140
II.3.2. Activité polygalacturonase 142
II.3.3. Détermination des températures et pH optimums 142
II.3.4. Caractérisation du mode d'action par oligoprofilage 144
II.4. Mutants knock-out de *pppg2* et *pppg3* 146

II.4.1. Génotypages de vérification 146
II.4.2. Composition des parois des mutants *pppg2*, *pppg3* et *pppg2/pppg3* 148
II.4.2.1. Détermination de la composition en monosaccharide 148
II.4.2.2. Détermination de la composition pariétale par détection des liaisons par FTIR 154
II.4.3. Activité polygalacturonase des mutants 158
II.4.4. Phénotypage des mutants *pppg2*, *pppg3* et *pppg2/pppg3* 160
II.4.4.1. Phénotypage de la croissance bidimensionnelle des mutants 160
II.4.4.2. Phénotypage de la croissance tridimensionnelle des mutants 162
II.4.4.3. Phénotypage des caulonémas agravitropiques des mutants 164
II.4.4.4. Production de protoplastes et phénotypages des régénérants des mutants 168
CHAPITRE III : LA POLYGALACTURONASE PpPG4 170
III.1. Etudes bio-informatiques de PpPG4 170
III.2. Caractérisation biochimique de PpPG4 172
III.2.1. Production et purification 172
III.2.2. Activité polygalacturonase 172
III.2.3. Caractérisation du mode d'action par oligoprofilage 172
III.3. Mutants surexpresseurs inductibles et phénotypage de iOX-PG4 174
CHAPITRE IV : MUTANTS MULTIPLEX PAR MÉTHODE CRISPR 176
IV.1. Obtention et génotypage de mutant CRISPR 176
IV.2. Analyses structurales des polygalacturonases affectées 178
DISCUSSION 182
MATERIELS ET METHODES 220
CHAPITRE I : ETUDES BIOINFORMATIQUES 220
I.1. Arbre phylogénétique 220
I.2. Analyse des séquences 220
I.3. Expressions des PGs de *P. patens* 222
I.4. Analyses statistiques 222
CHAPITRE II : ETUDES BIOCHIMIQUES 224
II.1. Production et purification des polygalacturonases 224
II.2. Dosage des protéines 226
II.3. Identification des protéines 228
II.4. Caractérisation biochimique 230
II.5. Identification des OGs 232
CHAPITRE III : ETUDES FONCTIONNELLES 236
III.1. Matériel végétal 236

III.2. Méthode de culture 236
III.3. Méthodes de phénotypage 238
III.3.1. Phénotypage des croissances bi- et tri-dimensionnelles 238
III.3.2. Phénotypage des caulonémas agravitropiques 240
III.3.3. Phénotypage des protoplastes 242
III.3.4. Immunohistochimie 244
III.4. Mutants *Physcomitrium patens* 246
III.4.1. Préparation des plasmides 246
III.4.2. Obtention des mutants 252
III.4.3. Génotypage des mutants *pppg2*, *pppg3* et *pppg2/pppg3* 256
III.4.4. Génotypage des mutants CRISPR 258
III.4.5. Composition en sucres neutres et acides de la paroi 258
III.4.6. Analyses de la paroi des mutants par FTIR 262
III.4.7. Activité polygalacturonase des mutants 264
REFERENCES 268

ABREVIATIONS

ADN Acide désoxyribonucléique

ADPG2 *ARABIDOPSIS DEHISCENCE ZONE POLYGALACTURONASE 2* d'*Arabidopsis thaliana*

AFM Atomic Force Microscopy

AGP Arabinogalactan-proteins

AIR Alcohol-insoluble Residues

APB Auxin-responsive Promoter Binding Protein (ancienne désignation)

ARF Response Factor (nouvelle désignation)

ARN Acide Ribonucléique

At *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*)

ATP Adénosine Triphosphate

AUC Aire sous la courbe (Area Under Curve)

AXS UDP/Apiose/UDP-Xylose Synthase

BAP 6-benzylaminopurine

BPP Bande préprophasique

CAZy Banque de donnée Carbohydrate Active Enzymes

CBM Module de liaison aux glucides (Carbohydrate-Binding Module)

CE Carbohydrate estérase

CESA	Cellulose synthase
CGR	*COTON GOLGI-RELATED*
CKS	CMP-Kdo Synthétase
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CrRLK1L	Protéine kinase 1 de type récepteur (RLK1- like kinase) de *Catharanthus roseus*
CSC	Complexe cellulose synthase
CsI	Cellulose synthase interactive protein
CSL	Cellulose synthase-Like
DA	Degré d'acétylation
DAMP	Damage-Associated Molecular Pattern
DCW	Matière sèche de paroi cellulaire (Dry Cell Wall)
DEK1	*DEFECTIVE KERNEL1* de *Physcomitrium patens*
Dha	Acide 3-deoxy-D-lyxo-2-heptulosarique
DIC	Differential Interference Contrast
DM	Degré de méthylesterification
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DP	Degré de polymérisation
EC	Epicathéchine

ECG Epicatéchine gallate

EDTA Ethylenediaminetetraacetic acid

EGC Epigallocatéchine

EGCG Epigallocathéchine gallate

EXP Expansine

EXL Expansine-Like

FER *FERONIA*

FPKM Fragments Per Kilobase of exon model per Million mapped fragments

FUT Fucosyltransférase

GalA Acide Galacturonique

GALS Galactane synthase

GALT Galactosyltransférase

GATL Galacturonosyltransférase-Like

GAUT Galacturonosyltransférase

GDP Guanosine diphosphate

GFP Green Fluorescence Protein

GH Glycosylhydrolase

GPI Glycosylphosphatidylinositol

GT	Glycosyltransférase
GTP	Guanosine triphosphate
HG	Homogalacturonane
HGME	Homogacturonan modifying enzyme
HPAEC	High-Performance Anion-Exchange Chromatography
HRGP	Glycoprotéine riche en hydroxyproline
INHS	Inhibiteur d'invertase
KAI2	*KARRIKIN INSENSITIVE2*
kDa	Kilo Dalton
Kdo	Acide 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic
KL	*KAI2-LIKE*
LRR	Leucine-Rich Repeat
LRX	Leucine-Rich Repeat Extensins
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight
MAP	Mitogen-activated protein
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MAX2	*MORE AXILLARY GROWTH 2*

MEB Microscopie électronique à balayage

MP3K Mitogen-activated protein kinase 3

OG Oligogalacturonide

O/N Toute la nuit (Overnight)

PAE Pectine acétylestérase

PAT Pectine acétyltransférase

PCR Polymerase chain reaction

PDB Banque de données Protein Data Bank

PERK Proline-Rich Extensin-like Receptor Kinase

PG Polygalacturonase

PGA Acide Polygalacturonique

PGIP Polygalacturonase Inhibitor Protein

PGL Polygalactyronate Lyase

PGLR *POLYGALACTURONASE OF LATERAL ROOT* d'*Arabidopsis thaliana*

PGX *POLYGALACTURONASE INVOLVED IN EXPANSION* d'*Arabidopsis thaliana*

pH Potentiel hydrogène

pI Point isoélectrique

PIN Protéine *PIN-FORMED*

PL	Pectate lyase
PLL	Pectate lyase-Like
PME	Pectine méthylestérase
PMEI	Pectin methylesterase Inhibitor
PMGL	Polyméthylgalacturonate lyase
PMT	Pectine méthyltransférase
PNL	Pectine lyase
Pp	*Physcomitrium patens* (*P. patens*)
PP60	Polyphenon 60
PRR	Plant Recognition Receptor
QRT3	*QUARTET-3* polygalacturonase d'*Arabidopsis thaliana*
RALF	Rapid Alkalinization Factors
RG	Rhamnogalacturonane
RGAE	Rhamnogalacturonane acétylestérase
RGGAT	RG-I Galacturonosyltransférase
RGGH	RG-I Galacturonohydrolase
RGL	RG-I Endo-lyase
RGP	UDP-Arabinose Mutase

RGRH RG-I Rhamnohydrolase

RGXT RhamnoGalacturonane specific XylosylTransferase

RHG RG-I Hydrolase

RIC Protéine ROP-Interacting CRIB-containing

RLK Receptor-like protein kinase

RMSD Root Mean Square Deviation

RMSF Root Mean Square Fluctuation

ROP Famille GTPases Rho des plantes (Rho Of Plants)

ROS Reactive Oxygen Species

RRT Rhamnosyltransférase

SAM S-adénosyl-méthionine

SBP Sugar Beet Pectin

SL Strigolactone

SMXL *SUPPROSSOR OF MAX2-LIKE*

TBL *TRICHOME BIREFRINGENCE-LIKE*

TPM Transcrits par kilobase

UDP Uridine diphosphate

UGD UDP-Glucose 6-Déhydrogénase

UGE	UDP-Glucose 4-Epimérase
UTR	Untranslated region
UXS	UDP-Xylose Synthase
WAK	Wall-associated Kinase
WAKL	WAK-Like (Wall-associated kinase like)
WT	Génotype sauvage (Wild Type)
XEH	Xyloglucane endohydrolase
XET	Xyloglucane endotransglycosylase
XG	Xylogalacturonane
XGD	Xylosyltransférase
XGH	Xylosylhydrolase
XTH	Xyloglucane endotransglycosylase/endohydrolase
XXXT	Xyloglucane Xylotransferase

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation schématique de la structure et composition d'une cellule végétale. 2

Figure 2 : Représentation schématique de la composition de la paroi primaire (A) et de la paroi secondaire (B) cellulaire végétale. 5

Figure 3 : Représentation schématique des principaux composants de la paroi cellulaire végétale et de leur composition. 9

Figure 4 : Représentation schématique de la biophysique de la croissance des cellules végétales. 11

Figure 5 : Photographies au microscope électronique à balayage de composants de la paroi. 13

Figure 6 : Schéma de la structure des différents domaines pectiques homogalacturonanes (HG), xylogalacturonanes (XG) et rhamnogalacturonanes de type I (RG-I) et de type II (RG-II). 25

Figure 7 : Schéma de la production et de l'assemblage des composants de la paroi primaire. 29

Figure 8 : Représentation schématique de la structure des HGs. 31

Figure 9 : Représentation schématique de la structure des RG-I. 33

Figure 10 : Représentation schématique de la structure des RG-II et de leur réticulations par le borate. 35

Figure 11 : Représentation schématique de la structure de la chaîne principale des RG-I et des sites d'action des différentes enzymes de dégradation des RG-I. 41

Figure 12 : Représentation schématique des modes d'actions des différentes enzymes modificatrices des homogalacturonanes (HGME). 45

Figure 13 : Représentation en ruban des structures tridimensionnelles de PME de tomate (à gauche) et de PMEI de kiwi (à droite). 49

Figure 14 : Représentation tridimensionnelle de la PME de tomate et de son site actif. 51

Figure 15 : Représentation tridimensionnelle en ruban de PAEs et NOTUM. 57

Figure 16 : Représentation en ruban des structure tridimensionnelles de PL de différentes familles polysaccharide lyases 1 (A, B et C), 10 (D et E) et 2 (F). 61

Figure 17 : Représentation du mode d'action par β-élimination catalytique des PL et PNL. 63

Figure 18 : Représentation des lieux de clivages des endo- et exo-polygalacturonases sur les HGs. 69

Figure 19 : Comparaison de structures tridimensionnelles entre une endo-polygalacturonase et une exo-polygalacturonase. 69

Figure 20 : Schéma de la processivité de PGLR et d'ADPG2. 71

Figure 21 : Représentation tridimensionnelle en ruban de PGs et PGIP. 75

Figure 22 : Activité de PGLR et ADPG2 par application exogène sur *Arabidopsis thaliana*. 77

Figure 23 : Arbre phylogénétique des plantes. 83

Figure 24 : Schéma du cycle de développement de *Physcomitrium patens*. 87

Figure 25 : Schéma du développement du gamétophyte de *Physcomitrium patens*. 93

Figure 26 : Formation de bourgeons et de ramifications de *Physcomitrium patens*. 95

Figure 27 : Cycle de croissance de *P. patens* et influences des facteurs environnementaux. 97

Figure 28 : Photos de protonémas de *Physcomitrium patens* regénérés depuis des protoplastes et marqués par des anticorps ou des CBMs. 101

Figure 29 : Photos de coupes transversales de gamétophores de *Physcomitrium patens* immunomarqués par des anticorps. 103

Figure 30 : Arbre phylogénétique de la famille des polygalacturonases. 111

Figure 31 : Phénotypage de la croissance bidimensionnelle de *Physcomitrium patens* sur milieu BCD avec PP60. 119

Figure 32 : Phénotypage de la croissance tridimensionnelle de *Physcomitrium patens* sur milieu BCD avec PP60. 121

Figure 33 : Phénotypage de la croissance des caulonémas agravitropiques de *Physcomitrium patens* sur milieu BCD en présence de PP60. 123

Figure 34 : Immunomarquage d'épitopes de composants pariétaux de *Physcomitrium patens* observé en microscopie confocale. 125

Figure 35 : Arbre phylogénétique des polygalacturonases de *Physcomitrium patens* (Pp), de *Marchantia polymorpha* (Mp) et d'*Arabidopsis thaliana* (At). 129

Figure 36 : Niveaux d'expression des polygalacturonases dans les différents organes de *Physcomitrium patens*. 131

Figure 37 : Représentations tridimensionnelles en ruban des alignements des structures de PpPG2 et PGLR..... 133

Figure 38 : Représentations tridimensionnelles en ruban des structures des protéines PpPG3, PGLR et QRT3..... 135

Figure 39 : Purification et activité de PpPG2 et PpPG3..... 137

Figure 40 : Tests d'activité de PpPG2 et PpPG3..... 139

Figure 41 : Oligoprofilage des produits de digestion de PpPG2 et PpPG3 analysés par LC-MS. 143

Figure 42 : Génotypage des mutants *pppg2*, *pppg3* et du double mutant *pppg2/pppg3*. ... 145

Figure 43 : Identification des monosaccharides constitutifs de la paroi cellulaire du génotype sauvage et des mutants *pppg2*, *pppg3* et *pppg2/pppg3* à 7, 14, 21 et 28 jours de développement par HPAEC. 147

Figure 44 : Caractérisation de la paroi cellulaire des protonémas par FTIR au cours du temps..... 153

Figure 45 : Degré de méthylation (DM) des pectines de *Physcomitrium patens* des mutants *pppg2*, *pppg3*, *pppg2/pppg3*, aux jours 7, 14, 21 et 28 de développement (n=8). 155

Figure 46 : Activité polygalacturonase totale des protéines extraites de matière fraîche de *Physcomitrium patens* à 28 jours de croissance de WT (vert), *pppg2* (orange), *pppg3* (rouge) et *pppg2/pppg3* (mauve) (n=6). 157

Figure 47 : Croissance bidimensionnelle des mutants *pppg2*, *pppg3* et *pppg2/pppg3* de *Physcomitrium patens* (n=12) sur les milieux de culture BCD et BCDAT, sur 28 jours de croissance. 159

Figure 48 : Phénotypage de la croissance tridimensionnelle des mutants *pppg2*, *pppg3* et *pppg2/pppg3* et du sauvage à 28 jours de croissance. 161

Figure 49 : Phénotypage des caulonémas agravitropiques des mutants *pppg2*, *pppg3* et *pppg2/pppg3* et du sauvage sur milieu BCD, après 7 et 14 jours de croissance à l'obscurité. 163

Figure 50 : Tailles moyennes des 25 premières cellules des caulonémas agravitropiques du sauvage et des mutants *pppg2*, *pppg3* et *pppg2/pppg3* de *Physcomitrium patens* sur milieu BCD après 14 jours de croissance à l'obscurité. 165

Figure 51 : Phénotypage des protoplastes régénérant des mutants *pppg2*, *pppg3* et *pppg2/pppg3* et du sauvage après 7 jours de croissance dans le milieu PRM. 167

Figure 52 : Représentations tridimensionnelles en ruban des alignements de structures de PpPG4 et PGLR..... 169

Figure 53 : SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie des différentes fractions de purification de PpPG4 : Wash et Elution qui contient la fraction purifiée de la protéine.. 171

Figure 54 : Résultats des tests d'activité optimum de PpPG4..... 171

Figure 55 : OGs libérés (en AUC, Area under curve) par l'action de PpPG4 sur PGA 1% (rouge) et DM35 1% (bleu), pendant 2 heures de digestion (2H, clair) et overnight (O/N, foncé)..... 171

Figure 56 : Phénotypage des surexpresseurs inductibles PpPG4 (iOX-PG4), clones #3 et clone #5. 173

Figure 57 : Génotypage des mutations induites par CRISPR dans les gènes PpPG1 (PG1), PpPG2 (PG2), PpPG3 (PG3) et PpPG6 (PG6) dans le clone #138. 175

Figure 58 : Comparaisons des structures tridimensionnelles prédites des protéines PGs mutées dans le clone #138. 177

Figure 59 : Présentation des sites actifs de PGs et comparaisons avec les protéines mutées #138. 179

Figure 60 : Schéma du vecteur pPICZα utilisé pour la production de protéine en système hétérologue *Pichia pastoris*. 223

Figure 61 : Schéma de la méthode de production de protéine par système hétérologue *Pichia pastoris*. 225

Figure 62 : Schéma représentatif du transfert de protéine sur la membrane PVDF. 229

Figure 63 : Plans de plaque de phénotypage de *Physcomitrium patens*. 237

Figure 64 : Schéma des constructions plasmidiques utilisées pour les transformations de *Physcomitrium patens*. 245

Figure 65 : Schéma des constructions plasmidiques utilisés pour les transformations de *Physcomitrium patens*. 247

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Ensemble des différences significatives entre les concentrations massiques des différents monosaccharides de la paroi des mutants *pppg2*, *pppg3*, *pppg2/pppg3* et du sauvage, à 7j, 14j, 21j et 28 jours de développement (Multiple comparaison Two-Way Anova). 149

Tableau 2 : Tableau des composants pour la préparation des gels SDS-Page. 227

Tableau 3 : Composition des milieux de culture de *Physcomitrium patens*..... 235

Tableau 4 : Composition du mix de PCR pour le génotypage des mutants, par tube. 255

Tableau 5 : Programme et conditions de PCR utilisés pour le génotypage des mutants avec la Taq polymérase Q5 HF..... 255

Tableau 6 : Méthode utilisée pour l'acquisition des spectres avec le logiciel LabSolutions IR. 261

RESUME

Résumé (FR) :

Caractérisation biochimique et fonctionnelle de polygalacturonases (PG) chez *Physcomitrium patens*.

La croissance et la morphogenèse végétales reposent sur un remodelage fin de la paroi cellulaire primaire, structure dynamique dont les propriétés mécaniques sont principalement modulées par les pectines. La structure des homogalacturonanes (HG), principal composant des pectines, est notamment finement contrôlée par les polygalacturonases (PG) et les pectine méthylestérases (PME). Dans cette thèse, *Physcomitrium patens* a été utilisé comme modèle pour analyser le rôle des PGs dans le développement, notamment au cours de la croissance du système végétatif des protonémas, composés de chloronémas et de caulonémas. L'utilisation du Polyphenon 60 (PP60), un inhibiteur polyphénolique des enzymes de remodelage pectique, a montré une augmentation globale de l'aire des protonémas, associée à une réduction de l'élongation cellulaire mais à une augmentation du branchement des caulonémas. Au contraire, le branchement des chloronémas est réduit, indiquant des réponses cellulaires différentes à l'altération du remodelage pectique. En parallèle, la production et l'analyse de mutants de délétion (*pppg2*, *pppg3*, et double mutant *pppg2/pppg3*), de surexpression (PPPG4 iOX) et de mutants multiples générés par méthode CRISPR-Cas9, révèlent que toute perturbation de l'activité des PGs (augmentation ou diminution), entraîne une réduction du développement des protonémas. Ces observations soulignent la nécessité d'un équilibre précis de la plasticité pariétale pour permettre l'expansion, la division et les branchements cellulaires. Ces effets contrastent avec l'absence d'impact notable sur le développement des gamétophores, suggérant que ces tissus différenciés dépendent moins du remodelage des HG et reposent davantage sur des réseaux de cellulose et d'hémicelluloses. Enfin, la caractérisation biochimique et structurale de plusieurs PGs de *P. patens* (PpPG2, PpPG3, PpPG4) confirme leur activité sur les HG, révèle des différences de spécificité enzymatique et identifie PpPG3 en tant que orthologue de AtQRT3, suggérant une diversité fonctionnelle au sein de cette famille. Les études effectuées durant cette thèse démontrent que les polygalacturonases sont des régulateurs clés de la morphogenèse des protonémas de *Physcomitrium patens* et ouvre des perspectives intégrant génétique, biochimie et mécanique pariétale pour mieux comprendre le rôle du remodelage pectique dans le développement végétal.

Mots clés : Parois végétales ; Pectines ; Polygalacturonases.

Abstract (EN):

Biochemical and functional characterization of polygalacturonases (PG) in *Physcomitrium patens*.

Plant growth and morphogenesis depend on controlled remodeling of the primary cell wall, a dynamic structure whose mechanical properties are mainly regulated by pectins, and in particular homogalacturonans (HGs). The fine structure of HGs is notably finely controlled by polygalacturonases (PGs) and pectin methylesterases (PMEs). In this thesis, *Physcomitrium patens* was used as a model to study the role of PGs in development, with a particular focus on the two-dimensional growth of protonemata, which consist of chloronemal and caulonemal cells. Treatment with Polyphenon 60 (PP60), a polyphenolic inhibitor of pectin-remodeling enzymes, led to an overall increase in protonemal area, combined with reduced cell elongation and increased branching of caulonemata, while chloronemal branching was reduced. This indicates that the two cell types respond differently to changes in pectin remodeling. In parallel, the analysis of deletion mutants (*pppg2*, *pppg3*, and the *pppg2/pppg3* double mutant), of an inducible overexpression line (PPPG4 iOX), and of multiple mutants generated using CRISPR–Cas9 method, showed that changes (increase or decrease) in PG activity impairs protonemal development. These results highlight the need for a precise balance of cell wall plasticity to allow proper cell expansion, division, and branching. In contrast, no major effects were observed on gametophore development, suggesting that these differentiated tissues are less dependent on HG remodeling and would depend more on cellulose and hemicellulose network. Finally, biochemical and structural analyses of several *P. patens* PGs (PpPG2, PppG3, PpPG4) confirmed their activity on HGs, revealing differences in substrate specificity, and identified PpPG3 as an ortholog of AtQRT3, indicating functional diversity within this enzyme family. Overall, this work demonstrates that polygalacturonases play a key role in regulating protonemal morphogenesis in *Physcomitrium patens* and provides a framework combining genetics, biochemistry, and cell wall mechanics to better understand pectin remodeling during plant development.

Key words : *Cell Wall ; Pectins ; Polygalacturonases.*

Résumé vulgarisé pour le grand public (FR) :

La croissance des plantes repose sur la paroi cellulaire primaire, une enveloppe qui entoure chaque cellule et doit être à la fois rigide et souple pour permettre le développement. Cette thèse utilise une mousse, *Physcomitrium patens*, pour comprendre comment certaines enzymes modifient cette paroi et influencent la croissance. En combinant des traitements chimiques, des plantes génétiquement modifiées et des analyses biochimiques, les travaux montrent que ces enzymes contrôlent l'allongement et la ramification des filaments responsables du développement de la plante. Lorsque leur activité est trop faible ou trop forte, le développement est perturbé, montrant qu'un équilibre précis est nécessaire. En revanche, les structures plus complexes et différenciées de la plante sont peu affectées, car elles possèdent des parois différentes. Ces résultats contribuent à mieux comprendre comment les plantes contrôlent leur développement et leur croissance à l'échelle cellulaire.

Mots clés : Parois végétales ; Pectines ; Polygalacturonases.

Simplified abstract for the general public (EN):

Plant growth depends on the primary cell wall, a layer that surrounds each cell and must be both rigid and flexible to allow development. This thesis uses a moss, *Physcomitrium patens*, to understand how certain enzymes modify the cell wall and influence plant growth. By combining chemical treatments, genetically modified plants, and biochemical analyses, this work shows that these enzymes control the elongation and branching of filaments that drive plant development. When their activity is too low or too high, normal growth is disturbed, showing that a precise balance is needed. In contrast, more complex and differentiated plant structures are less affected because they have different types of cell walls. These results help explain how plants control their growth and development at the cellular level.

Key words : Cell Wall ; Pectins ; Polygalacturonases.

PREAMBULE

La paroi végétale constitue une matrice extracellulaire complexe, dont les propriétés mécaniques conditionnent la morphologie cellulaire, la cohésion tissulaire et les capacités d'adaptation des plantes à leur environnement. Cette matrice, essentiellement composée de polysaccharides, notamment des pectines, est continuellement remodelée par plusieurs enzymes. Parmi celles-ci, les polygalacturonases catalysent l'hydrolyse des homogalacturonanes, les domaines pectiques majoritaires, participant à divers processus physiologiques de la plante, incluant l'élongation, la différenciation ou la division cellulaire. Si ces fonctions sont relativement bien décrites chez les plantes vasculaires, les déterminants biochimiques et fonctionnelles de ces enzymes demeurent encore insuffisemment documentés chez d'autres lignées, telles que les bryophytes.

Dans ce cadre, l'étude des polygalacturonases chez *Physcomitrium patens*, organisme modèle appartenant aux mousses, offre un système pertinent pour étudier la diversification des mécanismes de remodelage des pectines chez les différentes plantes terrestres. Ce travail vise ainsi à contribuer à une meilleure compréhension des dynamiques de la paroi végétale, tout en apportant des éléments susceptibles d'alimenter des approches appliquées en biotechnologie végétales et en valorisation des biomasses.

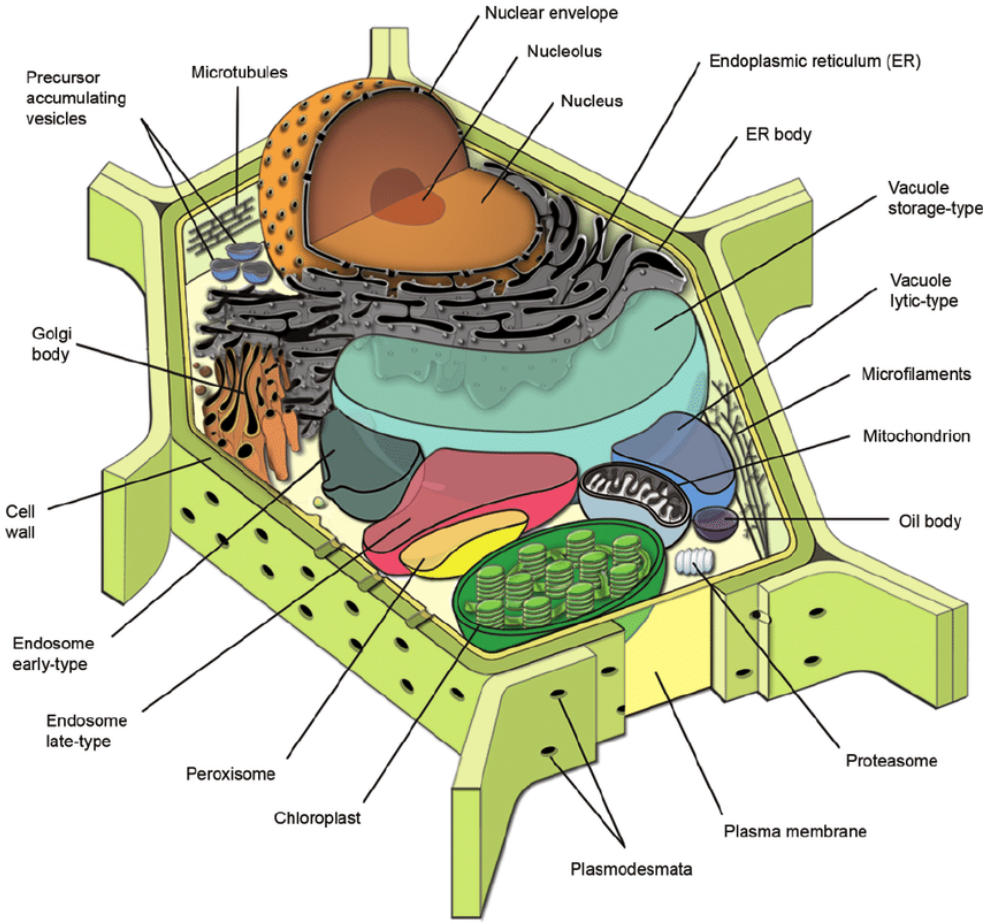


Figure 1 : Représentation schématique de la structure et composition d'une cellule végétale.

(Dhanoa et al., 2006)

INTRODUCTION

CHAPITRE I : ROLES ET COMPOSITION DE LA PAROI CELLULAIRE VEGETALE

I.1. La paroi cellulaire végétale

Les cellules végétales incarnent les entités à la fois structurelles et fonctionnelles fondamentales au sein des plantes **(figure 1)**. Leur particularité réside dans la présence d'organites spécifiques, tels que les différents plastes : chloroplastes responsables de la photosynthèse, amyloplastes qui stockent l'amidon et chromoplastes qui accumulent des pigments. On y trouve également les vacuoles, responsables de l'accumulation de diverses substances et du contrôle de la pression osmotique (Dünser et al., 2019 ; McFarlane et al., 2013). Autour de la cellule se trouve la paroi cellulaire végétale. Il s'agit d'une structure complexe qui se compose de plusieurs strates distinctes. Tout d'abord, la paroi primaire, principalement constituée de cellulose, d'hémicelluloses, de pectines et de protéines, exerce un rôle essentiel en conférant une résistance mécanique, prodiguant une protection contre les contraintes environnementales et facilitant la communication cellulaire (Burton et al., 2010 ; Caffall & Mohnen, 2009). Ensuite, la paroi secondaire, qui se forme autour de certaines cellules après la paroi primaire, notamment les cellules différenciées de conduction et de soutien retrouvées chez les plantes vasculaires. La paroi secondaire est plus épaisse et plus rigide en raison du dépôt de lignine, un polymère complexe qui confère une résistance mécanique exceptionnelle (Kang et al., 2019 ; Vega-Sánchez et al., 2013). L'adhésion entre les cellules se fait grâce à la lamelle moyenne, une fine couche composée principalement de pectines, facilitant les échanges intercellulaires. Ces composants interagissent pour octroyer aux cellules végétales leur intégrité structurale, leur résistance et leur capacité à croître tout en maintenant l'intégrité de la plante (Jarvis et al., 2003 ; Melelli et al., 2020).

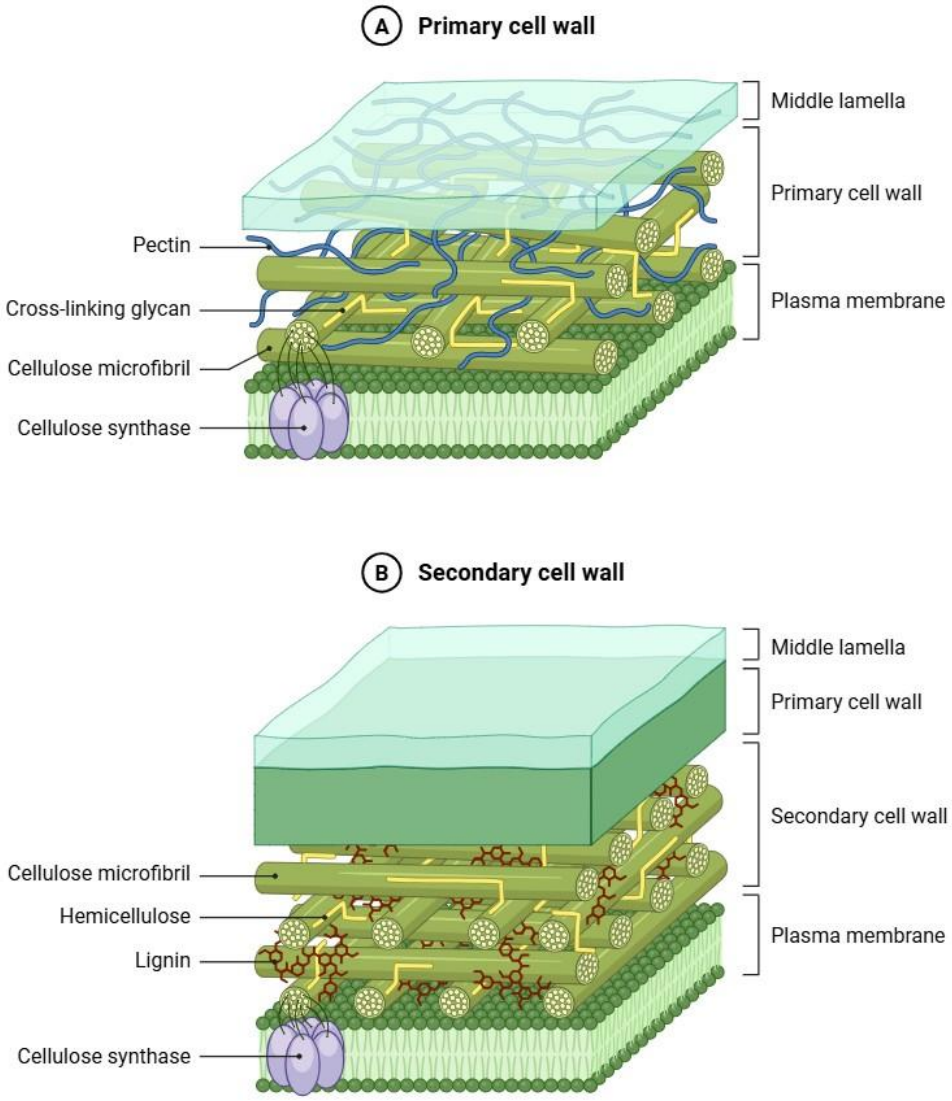


Figure 2 : Représentation schématique de la composition de la paroi primaire (A) et de la paroi secondaire (B) cellulaire végétale.

(Loix et al., 2017) Adapté sur BioRender

I.2. Organisation

La paroi cellulaire primaire représente une structure extracellulaire complexe et dynamique qui entoure les cellules végétales, jouant un rôle essentiel dans la morphogenèse, la protection, la communication et la résistance aux contraintes extérieures **(figure 2 A)**. Selon les espèces, la paroi primaire est composée d'environ de 30 à 50% de pectines, de 15 à 40% de cellulose, et de 20 à 30% de xyloglucanes et autres hémicelluloses, ainsi que des protéines. Les propriétés viscoélastiques de la paroi primaire sont aussi bien dues à ses composants constitutifs qu'à l'action des protéines qui lui sont associées (Cosgrove & Jarvis, 2012 ; Geitmann, 2010). La cellulose se présente en microfibrilles, qui sont des assemblages de 18 à 24 chaînes linéaires de celluloses (β-1,4-D-glucane), pour un diamètre de 3 à 4 nm, flexibles et d'orientation variable. Les microfibrilles de cellulose sont recouvertes ponctuellement de xyloglucanes qui les relient entre elles par liaisons hydrogènes pour former un réseau. Tandis que les pectines forment une matrice remplissant l'espace entre les microfibrilles. Les pectines peuvent également se lier aux microfibrilles de cellulose par des interactions électrostatiques, toutefois moins importantes que les liaisons des xyloglucanes à la cellulose (Zykwinska et al., 2008). Ces derniers, par ailleurs, semblent impliqués dans le maintien des structures et de l'agrégation de la cellulose (Anderson et al., 2010 ; Dick-Pérez et al., 2011). La paroi cellulaire primaire est synthétisée durant la croissance de la cellule et doit être à la fois suffisamment résistante pour contenir la pression de turgescence, mais également suffisamment flexible pour permettre l'extension cellulaire (Cosgrove & Jarvis, 2012 ; Hamant & Traas, 2010). Ces caractéristiques, d'apparence antagonistes, sont notamment dues à son remodelage dynamique provoqué par l'action de certaines protéines comme les expansines, qui permettent le relâchement des réseaux de cellulose et la réorganisation des microfibrilles, les xyloglucane hydrolases ou les enzymes de modification des pectines (Maris et al., 2009).

Il existe deux types de paroi cellulaires primaires. D'abord, la paroi primaire de type I, présente chez les dicotylédones et les monocotylédones non commélinidées, est souple et hydratée. Elle se compose d'une armature de cellulose associée à des hémicelluloses tels que les xyloglucanes, ainsi qu'une matrice riche en pectines, jusqu'à environs 35% de la composition pariétale. La paroi primaire de type II, caractéristique des monocotylédones commélinidées, telles que les graminées, est moins hydratée et plus rigide : les hémicelluloses sont surtout représentées par des arabinoxylanes et des bêta-glucanes.

Les pectines ne représentent seulement que 10% de la composition pariétale. De plus, la paroi primaire de type II a la particularité d'être réticulée par des composés phénoliques, tels que des composés féruliques ou coumariques, contribuant à la résistance mécanique des tissus végétaux (Delmer et al., 2024).

La paroi secondaire (**figure 2 B**), surtout présente chez les trachéophytes, est un composant majeur des tissus conducteurs et de soutien des plantes vasculaires. Elle est présente chez des cellules différenciées, telles que les cellules endodermiques, les trachéides ou les cellules scléreuses, par exemple. Elle est produite par apposition sous la paroi primaire. En comparaison à celle-ci, la paroi secondaire est plus épaisse et confère une rigidité et une résistance mécanique aux tissus végétaux (Cosgrove & Jarvis, 2012). En effet, certains composants retrouvés dans la paroi primaire, comme les pectines et les hémicelluloses de type xyloglucanes, sont ici remplacés par d'autres composants tels que la lignine, les xylanes et les glucomannanes (Mellerowicz & Sundberg, 2008). Ce sont à la fois son épaisseur, la structure spécifique et rigide de ses longues microfibrilles de cellulose, agrégées en un réseau plus compact que dans la paroi primaire, et sa composition, notamment en lignine, qui font que la paroi secondaire peut contrôler les propriétés mécaniques des plantes vasculaires. La lignine étant un polymère phénolique de monolignols, déposé dans la paroi cellulaire secondaire et s'associant aux polysaccharides pour rigidifier, imperméabiliser et renforcer mécaniquement la paroi. Le bois, par exemple, est le résultat de l'accumulation de parois cellulaires secondaires du xylème (Altaner & Jarvis, 2008 ; Barnett & Bonham, 2004 ; Mellerowicz & Sundberg, 2008).

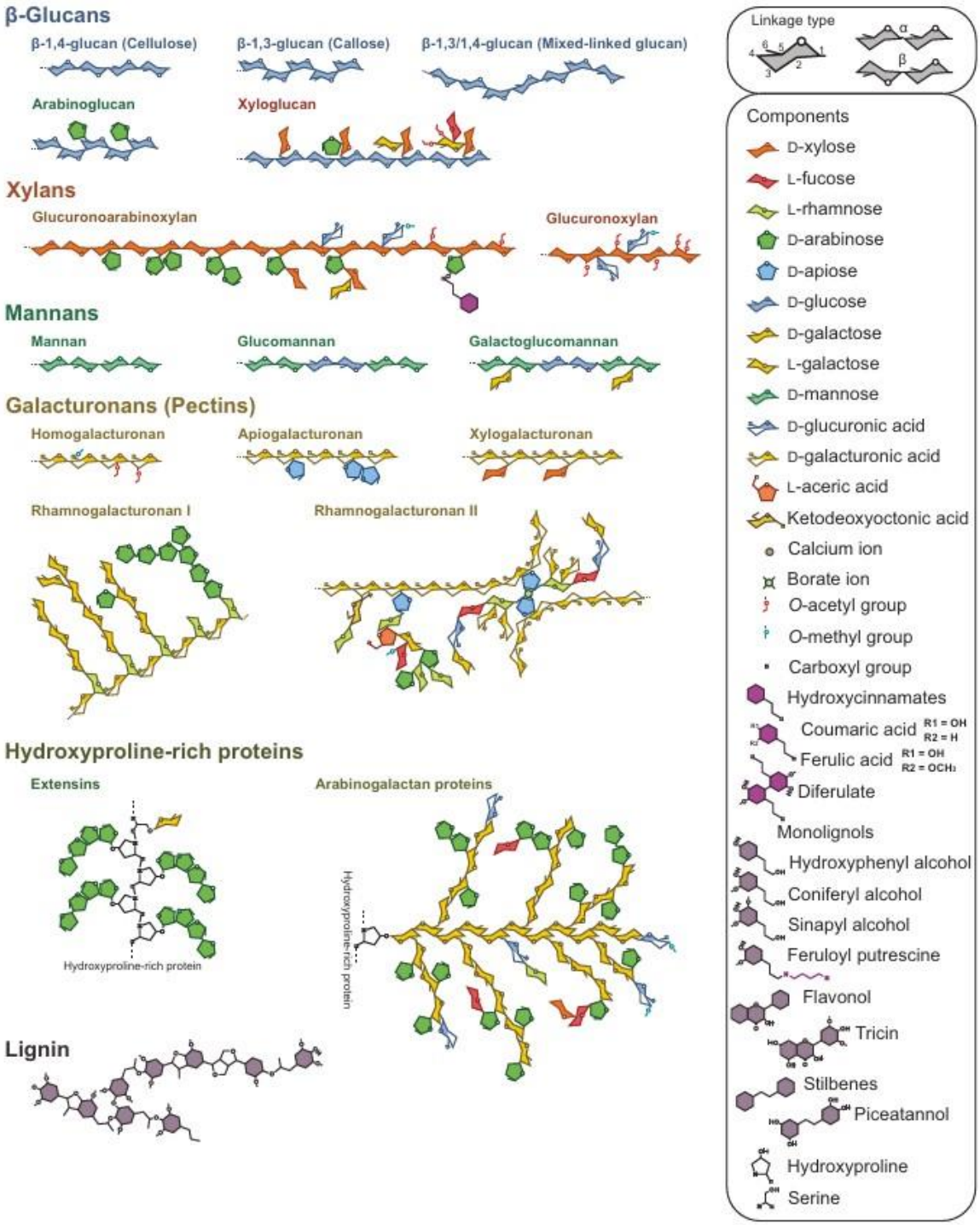


Figure 3 : Représentation schématique des principaux composants de la paroi cellulaire végétale et de leur composition.

(Fuertes-Rabanal et al., 2025)

I.3. Rôles et fonctions de la paroi primaire

Les rôles de la paroi cellulaire sont divers. Sa structure polymérique complexe et dynamique, dont les différents composants sont présentés dans la **figure 3**, assure à la fois la rigidité et le soutien mécanique des cellules végétales, tout en résistant à la pression de turgescence et aux forces extérieures. Cette pression, générée par l'entrée d'eau dans les vacuoles, peut atteindre plusieurs centaines de kilopascals, jusqu'à plus d'un mégapascal selon les tissus (Beauzamy et al., 2015). Elle participe à la croissance cellulaire, tandis que la paroi, par sa résistance mécanique, maintient la forme cellulaire. Par ailleurs, l'expansion cellulaire dépend du remodelage localisé de la paroi, notamment *via* l'action enzymes de remodelage des pectines, ainsi que l'action des expansines sur les réseaux de cellulose (**figure 4**) (Cosgrove, 2016). Ce remodelage localisé est essentiel à la morphogénèse, comme par exemple dans la morphologie des cellules pavimenteuses d'*Arabidopsis thaliana*, où les gradients de degrés de méthylation des pectines permettent des différences de rigidités localisées (Lin et al., 2022). Autre exemple, dans les méristèmes, où des relâchements locaux de rigidité pariétale, mesurées par AFM (Atomic Force Microscopy), précèdent la formation de nouveaux organes, comme des primordia foliaires (Beauzamy et al., 2015 ; Milani et al., 2011). Enfin, les plasmodesmes, traversant la paroi, permettent la communication intercellulaire et leur perméabilité dépend de la composition en pectines ainsi que l'accumulation de callose (Christensen et al., 2009). Mise à part ses rôles et fonctions structuraux, la paroi cellulaire agit également comme une barrière physique et biochimique contre différents types de stress biotiques ou abiotiques. Dans le cas des stress biotiques, notamment les attaques pathogènes, la dégradation de la paroi par les enzymes pathogéniques libère des oligosaccharides éliciteurs, tels que des oligogalacturonides (OGs), qui déclenchent des réponses immunitaires *via* des récepteurs de types WAKs ou CrRLK1L (Ferrari et al., 2013 ; Hamann, 2015). En réponse, la paroi altérée des plantes se retrouve paradoxalement renforcée, par réaction immunitaire, par dépôts de callose ou de lignine (Ninkuu et al., 2023 ; Wang et al., 2021). Par ailleurs, dans le cas de stress abiotiques, qu'il s'agisse de stress hydrique, de stress salin, ou stress thermique, la paroi peut agir comme un modulateur adaptatif. En cas de stress salin, il a été montré que la déméthylestérification des pectines et la formation de ponts calciques entre les chaines déméthylées augmentent la rigidité pariétale et permettrait de limiter les fuites ioniques afin de maintenir la turgescence (Gigli-Bisceglia et al., 2022). Lors d'un stress hydrique, la réorganisation des hémicelluloses et l'ajustement de l'activité des expansines ou d'autres enzymes de modifications des pectines,

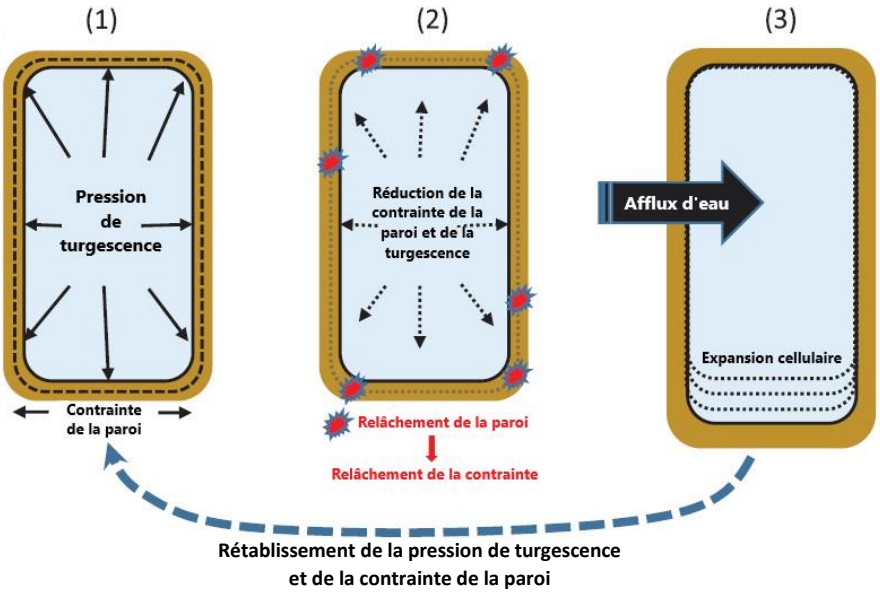


Figure 4 : Représentation schématique de la biophysique de la croissance des cellules végétales.

Ce schéma illustre le concept du relâchement pariétal et de son lien avec la pression de turgescence et les flux d'eau induits. (1) Dans une cellule bien hydratée qui n'est pas en croissance, la cellule atteint un équilibre osmotique. Les contraintes exercées par et sur la paroi sont contrebalancés par la force exercée vers l'extérieur par la pression de turgescence. (2) Les parois des cellules en croissance se relâchent, de par l'action des protéines pectinases et lyases, entraînant une réduction des contraintes sur la paroi cellulaire et la pression de turgescence. (3) La réduction de la pression de turgescence et le potentiel hydrique entraînent un afflux d'eau vers l'intérieur de la cellule, augmentant ainsi son volume et provoquant son expansion grâce au relachement pariétal, jusqu'au rétablissement de la pression de turgescence.

(Cosgrove, 2016) Adapté et traduit.

permettent de préserver la cohésion pariétale et d'éviter la déshydratation cellulaire (Le Gall et al., 2015). Le stress thermique induit également l'expression de certains gènes codant des enzymes de remodelage des pectines, tel que *PME34* chez *Arabidopsis thaliana*, favorisant une plasticité pariétale accrue (Y. C. Huang et al., 2017).

Outre la modification des polymères pariétaux, il a également été montré qu'en réponse aux stress, les protéines pariétales comme les extensines et les protéines arabinogalactanes (AGPs) participent activement au maintien de l'intégrité pariétale. Les extensines forment des réseaux réticulés rigides par liaisons covalentes. Et les AGP facilitent les interactions entre polysaccharides (Zagorchev et al., 2014). Ainsi, la paroi cellulaire végétale, loin d'être une simple enveloppe inerte, représente un système complexe assurant la croissance cellulaire, le soutien, la communication, la protection et l'adaptation afin de permettre un développement harmonieux en réponse à l'environnement.

I.4. Composition de la paroi primaire

I.4.1. La cellulose

La cellulose est un polysaccharide linéaire constitué d'une chaîne non ramifiée de glucoses reliés par des liaisons β-1,4 glycosidiques. Les résidus de glucose sont orientés en configuration β, ce qui permet aux unités de glucose de s'aligner en parallèle, favorisant ainsi la formation de microfibrilles cristallines dans la paroi cellulaire (Rodrigues Mota et al., 2018). La synthèse de la cellulose est catalysée par les complexes cellulose synthases (CSC) qui sont localisées dans la membrane plasmique. Ces complexes sont formés de plusieurs protéines, notamment les protéines catalytiques de la cellulose synthase (CESA), formant un hexamère de lobes trimériques synthétisant 18 chaines de glucanes à partir d'UDP-glucose, formant ainsi 18 chaînes linéaires qui composeront une seule microfibrille (Speicher et al., 2018 ; Turner & Kumar, 2018). Les microfibrilles de cellulose se lient par liaisons hydrogènes pour former des faisceaux qui confèrent la rigidité et la résistance mécanique caractéristiques de la paroi cellulaire végétale (Nishiyama, 2009). En effet, les microfibrilles de cellulose agissent comme un réseau de support qui empêche la cellule de se déformer sous l'effet de la pression générée par l'absorption d'eau. Cette résistance mécanique est essentielle pour la croissance verticale des plantes terrestres et leur capacité à maintenir une structure stable malgré les variations de pression (Schopfer, 2006).

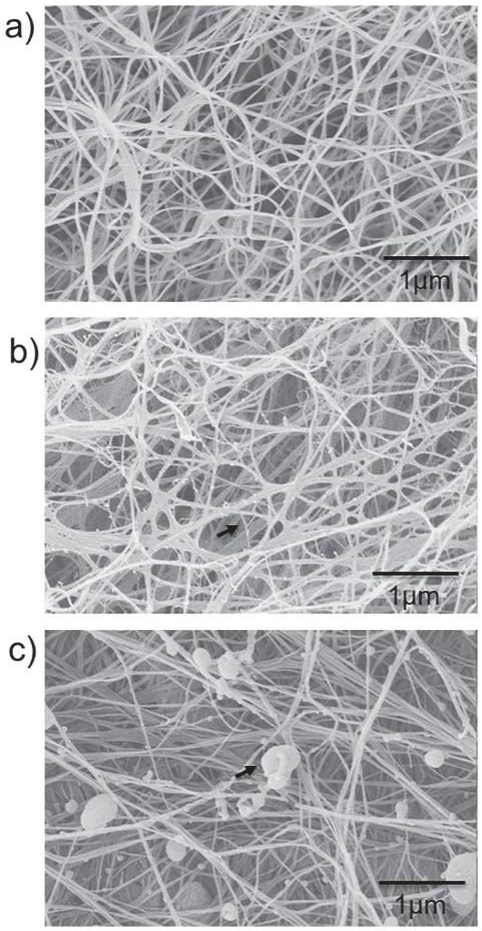


Figure 5 : Photographies au microscope électronique à balayage de composants de la paroi.

(a) *Visualisation de fibres de cellulose au microscope électronique à balayage (MEB) ;* ***(b)*** *Visualisation de cellulose et de xyloglucanes formant des réticulations (flèche noire) ; et* ***(c)*** *visualisation de cellulose et d'arabinoxylane formant des agrégats (flèche noire).*

(Lopez-Sanchez et al., 2015)

La rigidité conférée par la cellulose est également cruciale pour le maintien de la forme de la cellule et pour résister aux forces mécaniques extérieures. En outre, la cellulose interagit avec d'autres composants de la paroi cellulaire, tels que les hémicelluloses et les protéines, contribuant ainsi à la cohésion globale de la paroi (Griffiths & North, 2017).

I.4.2. Les hémicelluloses

Les hémicelluloses sont des polysaccharides complexes et branchés, composés de différents types de monomères tels que le D-xylose, D-glucose, L-arabinose. Leur biosynthèse est réalisée dans l'appareil de Golgi par des glycosyltransférases (GT) à partir de différents sucres nucléotidiques comme le GDP-mannose ou le GDP-glucose par exemple. Certaines glycosyltransférases produisent la chaine principale des hémicelluloses, telles que les cellulose synthase-like C (CSLC) ou A (CSLA), synthétisant spécifiquement les chaînes β-1,4-glucane des xyloglucanes, ou des mannanes, respectivement. D'autres GT produisent les chaînes latérales et des substitutions, conférant aux hémicelluloses leurs propriétés structurales et leur capacité d'interaction avec la cellulose. Par exemple, les XXT1, de la famille GT34, ajoutent des résidus de xylose sur la chaine principale de glucane, ou encore les FUT1, de la famille GT37, qui ajoutent du fucose sur les xylogucanes (Pauly et al., 2013). Les hémicelluloses sont formées de trois constituants différents : (1) Les xylanes qui sont des polymères de xylose liés en β(1→4); (2) Les xyloglucanes qui sont des polymères de glucose liés en β(1→4) et ramifiés en α(1→6) généralement par du xylose ; (3) Les arabinoxylanes qui sont des polymères de xylopyranosides liés β(1→4) et substitués en O-2 et/ou O-3 par des monomères arabinofuranosyl ; (4) les mannanes, polymères de mannose liés en β(1→4). Les hémicelluloses interagissent avec la cellulose et les pectines pour former une matrice tridimensionnelle dans la paroi cellulaire (Broxterman & Schols, 2018 ; Mélida et al., 2020). Les hémicelluloses jouent un rôle crucial dans la fonction mécanique et structurale de la paroi cellulaire végétale. Elles agissent comme des liens entre les microfibrilles de cellulose par de multiples liaisons hydrogènes et modulent la flexibilité à la paroi. Cette flexibilité est essentielle pour permettre l'élongation cellulaire lors du développement végétal. Les hémicelluloses contribuent également à la résistance mécanique globale de la paroi en liant, par liaisons non-covalentes, les différentes composantes de la paroi cellulaire **(figure 5)** (Cosgrove, 2016 ; Lopez-Sanchez et al., 2015).

Par ailleurs, la structure des hémicelluloses est régulée par diverses enzymes qui assurent leur remodelage au sein de la paroi. Les xyloglucane endotransglycosylase/hydrolases (XTH), par exemple, modifient le réseau de xyloglucanes dans la paroi. Les xyloglucane endotransglycosylases (XET) transfèrent des fragments de xyloglucane entre les chaînes, alors que les xyloglucane endohydrolases (XEH) hydrolysent les chaînes de xyloglucane (voir **I.4.3.4.**). Ces enzymes modulent les interactions entre les xylogucanes et la cellulose, permettant un relâchement contrôlé de la paroi (Ishida & Yokoyama, 2022). D'autres enzymes, comme les endo-β-1,4-xylanases (GH10, GH11) ou les endo-β-1,4-mannanases (GH5, GH26), qui hydrolysent spécifiquement les chaînes de xylanes et de mannanes, par exemple (Kolenová et al., 2006 ; Xu et al., 2002).

Les hémicelluloses participent également à la régulation de l'interaction de la cellule avec son environnement. Elles peuvent influencer la perméabilité de la paroi cellulaire, affectant ainsi le mouvement de l'eau et des nutriments entre les cellules et leur environnement. De plus, certaines hémicelluloses peuvent servir de sites de liaison pour d'autres composants de la paroi, tels que les protéines, jouant un rôle dans la communication intercellulaire et la signalisation (Burton et al., 2010). Enfin, certains fragments d'hémicellulose, libérés par l'action d'enzymes pathogènes, comme par exemple des oligosaccharides d'arabinoxylanes, peuvent agir comme des DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns), reconnus par des récepteurs de l'immunité végétale PRRs (Plant Recognition Receptors). Ces récepteurs, localisés à la surface des cellules végétales, induisent des voies de signalisations liées à la réponse immunitaire comme la production d'espèces réactives d'oxygène ROS, des MAP kinases ou encore modifier l'expression de certains gènes permettant à la plante de s'adapter face au pathogène (Mélida et al., 2020).

I.4.3. Les protéines pariétales

I.4.3.1. Les expansines

Parmi les protéines structurales présentes dans la paroi, on trouve différentes classes. Les expansines, des petites protéines faisant environ 30 kDa, se divisent en 4 groupes, les expansines α (EXPA) et β (EXPB), puis les expansines-like A (EXLA) et B (EXLB) (Zagorchev et al., 2014). Elles ont été identifiées comme des protéines capables d'induire rapidement un relâchement des parois cellulaires sans activité enzymatique. Elles auraient pour rôle de réduire les liaisons non covalentes entre les polysaccharides de la paroi, cellulose et hémicelluloses, pour faciliter le relâchement de celles-ci sous la pression de turgescence (Cosgrove, 2016). De plus, de nombreux gènes codant des expansines sont régulés par certaines hormones, modulant la croissance ou la modification de la paroi cellulaire. L'auxine, par exemple, induit l'augmentation de l'expression de NtEXPA1 et NtEXPA4, tandis que les brassinostéroïdes peuvent inhiber les NtEXPA1 mais augmente l'expression de NtEXPA4 chez le tabac. (Bergonci et al., 2014 ; Kuluev et al., 2014 ; Song et al., 2011). Ainsi, elles jouent un rôle essentiel dans la croissance et le développement de la plante, ainsi que dans l'adaptation aux conditions de stress et à la sénéscence (Balkova et al., 2025).

I.4.3.2. Les extensines

Les extensines sont une famille de glycoprotéines riches en hydroxyproline (HRGP) également présentes dans la paroi. Elles sont caractérisées par des motifs répétitifs riches en sérine et en proline (Ser-Pro_3-), dont les résidus proline sont hydroxylés, pour former des motifs sérine et hydroxyproline (Ser-Hyp_3-) et O-glycosylés, principalement par des chaînes d'arabinose. Certaines régions possèdent des motifs tyrosine (Tyr-X-Tyr) permettant la formation de liaisons covalentes entre résidus Tyr par formation de ponts isodityrosine, catalysées par des peroxydases pariétales, formant un réseau protéique insoluble intégré à la matrice pectocellulosique. Les extensines jouent un rôle dans le renforcement mécanique de la paroi primaire et la régulation de sa plasticité au cours de la croissance cellulaire (Mishler-Elmore et al., 2021 ; Zagorchev et al., 2014). Elles sont régulées par des modifications post-traductionnelles, notamment l'hydroxylation des prolines, qui module leur réticulation covalente.

Certaines extensines peuvent également être régulées transcriptionnellement, comme le montre le gène *AtExt1* d'*Arabidopsis thaliana*, exprimé tout au long du développement et fortement induit par divers stress biotiques et abiotiques (Castilleux et al., 2021 ; Merkouropoulos & Shirsat, 2003).

I.4.3.3. Les AGPs

Les arabinogalactan-protéines (AGPs) sont également des glycoprotéines riches en hydroxyprolines (HRGP) présentes dans la paroi. En plus de leur composante protéique, elles sont majoritairement constituées de chaînes d'arabinogalactanes β-1,3/β-1,6 souvent terminées par de l'arabinose, du glucuronate ou du rhamnose. Elles peuvent être localisées dans la paroi, ou ancrées à la membrane plasmique par une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI). Les AGPs forment des liaisons non covalentes avec les pectines et les hémicelluloses, jouant ainsi un rôle dans la structure et la plasticité pariétale, influençant l'expansion cellulaire, la morphogénèse, et participent à l'adaptation aux stress. En intéragissant avec ces composants de la paroi, elles participent à la détection de la tension pariétale, notamment en transmettant des signaux à la cellule par modulation de la concentration de Ca^{2+} cytosolique, ou par signalisation extracellulaire (Ma & Johnson, 2023 ; Zagorchev et al., 2014). Elles sont régulées par des facteurs transcriptionnels, en fonction du stade de développement ou encore en cas de stress biotiques ou abiotiques, notamment par voies hormonales telles que les signalisation auxine ou cytokinine. Les modifications post-traductionnelles comme l'hydroxylation des prolines, l'O-glycosylation ou l'ancrage GPI modulent également leurs interactions avec les pectines ou les hémicelluloses, ou encore leur localisation, pariétale ou membranaire (Leszczuk et al., 2023).

I.4.3.4. Les XTHs

Les xyloglucane endotransglycosylase/hydrolases (XTH), sont des enzymes pariétales de la famille des glycoside hydrolases (GH) GH16, regroupant les xyloglucanes endotransglycosylase (XET) qui transfèrent des fragments de xyloglucane d'une chaîne à une autre pour un remodelage modéré. Tandis que les xyloglucanes endohydrolases (XEH) hydrolysent les chaînes de xyloglucane pour un remodelage. L'action de ces enzymes module les interactions entre le xyloglucane et la cellulose pour permettre un relachement contrôlé de la paroi (Ishida & Yokoyama, 2022).

Les XTHs sont régulées transcriptionnellement selon le tissu et le stade de développement, ou encore par des voies de signalisation hormonales (auxine, éthylène) ou stress abiotiques. Leur activité peut être modulée post-traductionnellement par glycosylation ou clivage protéolytique, influençant leur localisation et stabilité. Contrairement aux extensines et aux AGPs, elles n'interagissent pas par liaisons covalentes ou non covalentes avec les polysaccharides mais agissent par action enzymatique pour restructurer le réseau hémicellulose et cellulose (Méndez-Yañez et al., 2017 ; Zhang et al., 2025).

I.4.3.5. Les récepteurs

Enfin, il existe des récepteurs membranaires impliqués dans la régulation de la paroi cellulaire, comme les Wall-Associated Kinases (WAKs) qui sont associées aux pectines et qui peuvent réguler à la fois l'expansion cellulaire et la réponse aux pathogènes lorsqu'ils sont activés, par des OGs ou des PAMP (pathogen associated molecular patterns) par exemple. Lorsqu'ils sont activés, les WAKs peuvent activer des voies de signalisation comme celles impliquant MP3K (mitogen-activated protein kinase 3), une protéine kinase jouant un rôle dans la transduction de signal et de signalisation intracellulaire. Ces protéines WAK permettraient de moduler la transition entre l'état de croissance et l'état de défense, ou stress, selon les conditions (Kohorn, 2016).

Les récepteurs FERONIA (FER) sont des protéines kinases, de type CrRLK1L, situés dans la membrane plasmique, qui jouent un rôle clé dans la perception de l'état mécanique de la paroi et la signalisation hormonale. FER détecte notamment des peptides Rapid Alkalinization Factors (RALFs) et module les flux de Ca^{2+} et les réponses à la croissance cellulaire, au remodelage de la paroi et à la défense contre les stress biotiques et abiotiques. Elle agit comme un récepteur de la cohésion entre la membrane et la paroi, coordonnant l'expansion cellulaire et la signalisation intracellulaire. La liaison RALF-FER déclenche une cascade de phosphorylation intracellulaire et influence la rigidité de la paroi. Cette liaison module notamment les pompes à protons (H^+-ATPases) de la membrane plasmique pour réduire la sortie de protons et augmenter le pH apoplastique, donc provoquer une alcalinisation, pour réduire l'activité des enzymes et augmenter la réticulation des pectines et des extensines pour renforcer la rigidité de la paroi (Liao et al., 2017).

Les protéines Leucine-Rich Repeat/Extensins (LRXs) sont, quant à elles, des glycoprotéines hybrides, liant la membrane à la paroi, composées d'un domaine riche en leucine (LRR) pour la signalisation et d'un domaine extensine pour l'ancrage à la paroi. Elles régulent la croissance et la morphogenèse en modulant les interactions entre les extensines, AGPs et la matrice pectocellulosique (Draeger et al., 2015). Elles coopèrent également avec des récepteurs CrRLK1L, comme FER, pour transmettre les signaux mécaniques et contrôler l'intégrité pariétale (C. Zhao et al., 2021).

Enfin, les Proline-rich Extensin-like Receptor Kinases (PERKs) sont des récepteurs transmembranaires avec un domaine extracellulaire riche en Proline, capable d'interagir avec la paroi cellulaire, et un domaine kinase cytoplasmique qui transmet des signaux intracellulaires. Les PERKs jouent un rôle dans la détection de la structure de la paroi, la régulation de la croissance cellulaire et la signalisation redox, en activant des voies de signalisation, modulant les péroxydases pariétales et d'autres enzymes produisant des espèces réactives d'oxygène (ROS) dans l'apoplaste. Leur expression est régulée selon le développement et les stress biotiques ou abiotiques, et leur activité peut être modulée par phosphorylation. Ces caractéristiques font des PERKs des acteurs clés du dialogue entre la paroi et la cellule (Invernizzi et al., 2022).

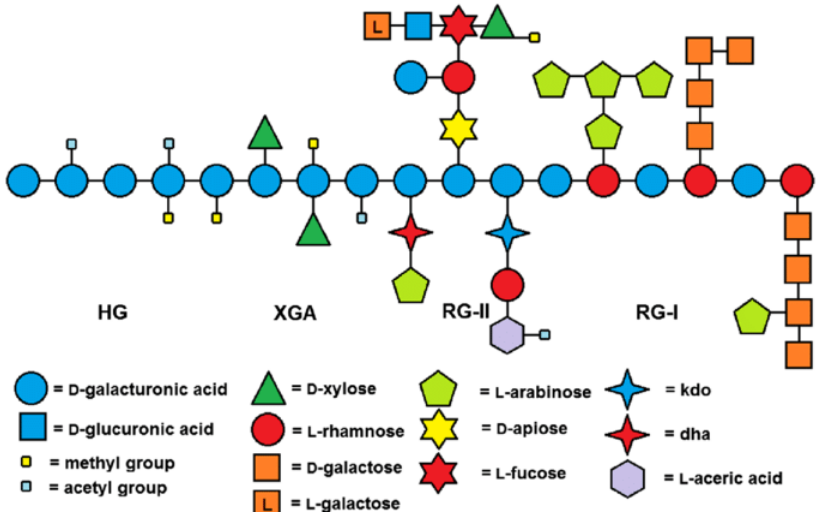


Figure 6 : Schéma de la structure des différents domaines pectiques homogalacturonanes (HG), xylogalacturonanes (XG) et rhamnogalacturonanes de type I (RG-I) et de type II (RG-II).

*Kdo : 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid. **Dha : 3-deoxy-D-lyxo-hept-2-ulosonic acid

(Kuivanen et al., 2019)

I.4.4. Les pectines

I.4.4.1. Généralités

En tant que composants majeurs de la matrice pectique, les pectines participent à la formation de liaisons avec d'autres composants de la paroi, tels que la cellulose et les hémicelluloses. Cette interaction contribue à la résistance mécanique de la paroi et à son maintien structural (Hocq et al., 2017). Les pectines, avec leur diversité, confèrent des propriétés physico-chimiques à la paroi cellulaire. Elles peuvent agir comme des sites de reconnaissance pour les interactions intercellulaires, avec les WAKs ou d'autres protéines en fonction de leurs motifs glucidiques spécifiques, influencer la perméabilité de la paroi et jouer un rôle dans la régulation de la croissance et du développement des tissus végétaux. De plus, les pectines sont impliquées dans la réponse aux stress environnementaux et dans les mécanismes de défense des plantes (Le Gall et al., 2015 ; Wang et al., 2023).

Les pectines sont des polysaccharides complexes présents dans la paroi primaire cellulaire végétale, principalement constituées d'acide α-1,4-D-galacturonique. Elles se déclinent en plusieurs domaines, notamment les homogalacturonanes (HG), les rhamnogalacturonanes (RG) de type I (RG-I) et II (RG-II), et les xylogalacturonanes (XG) (**figure 6**). Les pectines, de part leur diversité, confèrent des propriétés spécifiques à la paroi cellulaire.

Les HGs, qui représentent entre 60% et 70% des pectines au sein de la paroi primaire, sont des chaînes linéaires d'acides D-galacturoniques, pouvant être méthylées en C_6 ou acétylées en O_2 et/ou O_3 (Caffall & Mohnen, 2009). Les RG-I constituent entre 20% et 35% des pectines totales et sont composés d'une chaîne de dimères d'acides D-galacturonique (GalA) et de rhamnose (Rha). Les RG-I sont ramifiés par des arabinanes et des galactanes. Ces chaînes latérales peuvent atteindre plusieurs dizaines de résidus, permettant aux RG-I d'avoir une structure très hétérogène, flexible et hydratée (Round et al., 2010). Les RG-II, représentant entre 1% et 5% des pectines, sont des chaînes d'acides D-galacturoniques liées en α(1→4), ramifiées par plusieurs chaînes latérales composées de divers sucres, comme par exemple l'apiose, lié à la chaîne principale en liaison α(1→2), le galactose en β(1→3), du rhamnose en α(1→3) entre autres.

Enfin, les XGs, formant moins de 1% des pectines, sont des chaînes d'acide galacturoniques liés en α(1→4), substitués en xylose par liaisons β(1→3) et participent à la cohésion entre pectines, cellulose et hémicelluloses (Jensen et al., 2008).

La structure complexe des pectines forme un gel dû aux ramifications des domaines pectiques substitués, des liaisons ioniques avec le calcium ou le bore, ou encore avec des interactions hydrophobes ou hydrophiles. La présence de pectines, en particulier des homogalacturonanes (HG) faiblement méthylés, favorise les liaisons avec les ions calcium Ca^{2+}, permettant la dimérisation des chaînes pectiques par les structures « boîtes à œufs ». Cela renforce les interactions entre les chaînes pectiques (Mierczyńska et al., 2015 ; Mohnen, 2008; Wang et al., 2023). De la même manière, les RG-II forment des liaisons ioniques avec du bore entre des domaines RG-II de différentes chaînes (Funakawa & Miwa, 2015 ; Hays et al., 2025). L'absence de ces ponts borate, dans le cas de chélation par l'EDTA, ou de mutations, tel que *bor1* chez *Arabidopsis thaliana*, provoque des phénotypes de morphogénèse réduite dus à la perte de cohésion des domaines pectiques RG-II de la paroi (Caffall & Mohnen, 2009 ; Funakawa & Miwa, 2015). En cas d'augmentation de l'acidité, les pectines fortement méthylés interagissent davantage entre elles par liaisons hydrophobes (Alba et al., 2017). L'activité des différentes protéines présentes dans la paroi, incluant les pectinases, a également un effet sur la structure des pectines et donc sur l'organisation et la rhéologie de la paroi cellulaire (Atta & Ruiz-Larrea, 2022 ; Tapre & Jain, 2014).

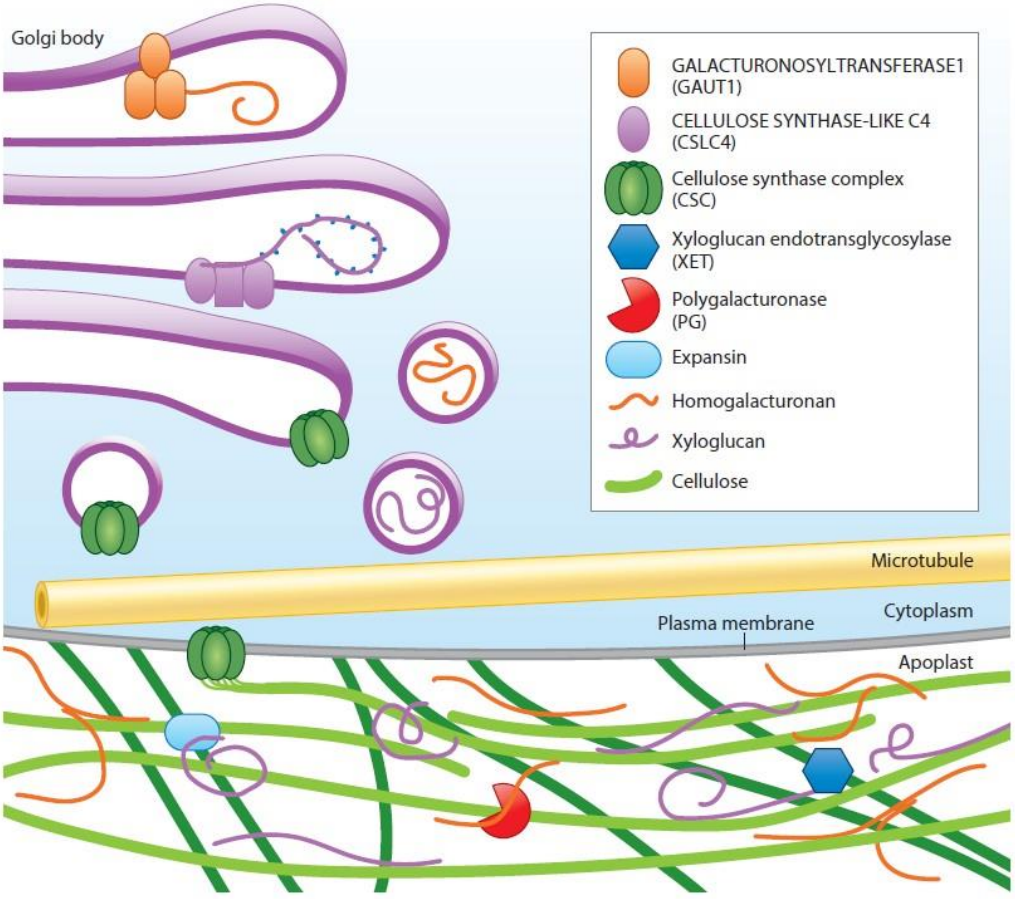


Figure 7 : Schéma de la production et de l'assemblage des composants de la paroi primaire.

Différents composants de la paroi, tels que les pectines (en orange) et des hémicelluloses comme le xyloglucane (en violet), sont synthétisés dans l'appareil de Golgi par des glycosyltransférases, notamment GAUT1, et des celluloses synthase-like, notamment CSLC4, respectivement. Les complexes de cellulose synthase (CSC, en vert) sont également transportés du Golgi vers la membrane plasmique où ils synthétisent la cellulose (en vert) en dehors de la cellule, dans l'apoplaste, pour intégrer la paroi cellulaire. Les pectines, les hémicelluloses, la cellulose et les protéines interagissent ensemble dans la paroi cellulaire. Notamment les polygalacturonases (PG, en rouge), les xyloglucane endrotransglycosylases (XET, en bleu foncé) et les expansines (en bleu clair), qui peuvent modifier la structure de la paroi en agissant sur leurs substrats respectifs, pour permettre la croissance et le développement de la plante.

(Anderson & Kieber, 2020)

Les pectines sont synthétisées au sein des cellules végétales, plus précisément dans l'appareil de Golgi où elles traversent les compartiments cis, médian et trans pour conduire à la construction de polysaccharides complexes suivant les processus biosynthéthiques spécifiques à chacun des compartiments **(figure 7)**. Les pectines sont ensuite transportées vers la paroi cellulaire par des vésicules (A. Nebenführ & L. Staehelin, 2001). Les pectines sont ainsi produites et modifiées à l'intérieur de la lumière de Golgi, par au moins 67 enzymes différentes. Parmi elles se trouvent les glycosyltransferases (GTs) qui ont pour fonction de transférer des résidus glycosyl de nucléotide-ose à des polysaccharides, donc de produire les chaines principales des pectines, ou diverses ramifications osidiques selon leurs fonctions spécifiques (Cumming et al., 2005). Les glycosyltransferases de Type 1 synthétisent les chaines principales des pectines. Tandis que les glycosyltransferases de Type 2 y ajoutent des substitutions, voire des ramifications en chaines latérales (Anderson & Kieber, 2020 ; Scheible & Pauly, 2004). On trouve parmi ces enzymes diverses familles comme par exemple les galacturonosyltransferases (GAUT), les β-1,4-galactan, dont certaines se comportent comme des β-1,4-galactosyltransferases (GALT), ou encore les RG-II xylosyltranferases (RGXT) ayant pour rôle de transférer des résidus d'acides galacturoniques, de galactose et de xylose respectivement, sur la chaine principale HG, pour les GAUT, ou en ramifications sur les RG pour les GALS et les RGXT (Madrid Liwanag et al., 2013; McCarthy et al., 2014). Pendant la synthèse, certains galacturonates des HGs subissent des modifications telles que des esterifications produites par des pectine méthyltransferases, ou des acetylations produites par les pectine acetyltransferases. Dans certains cas, d'autres modifications spécifiques de certaines espèces végétales, peuvent se produire, comme des feruloylation par des feruloyltransférases, sur des résidus des chaînes latérales des RG-I. Pour chacune de ses modifications, leur substrats respectifs, le S-adenosyl-methionine (SAM), l'acetylCoA et le feruloylCoA, sont requis dans l'appareil de Golgi (Abdel-Massih et al., 2003 ; Bouvier et al., 2006).

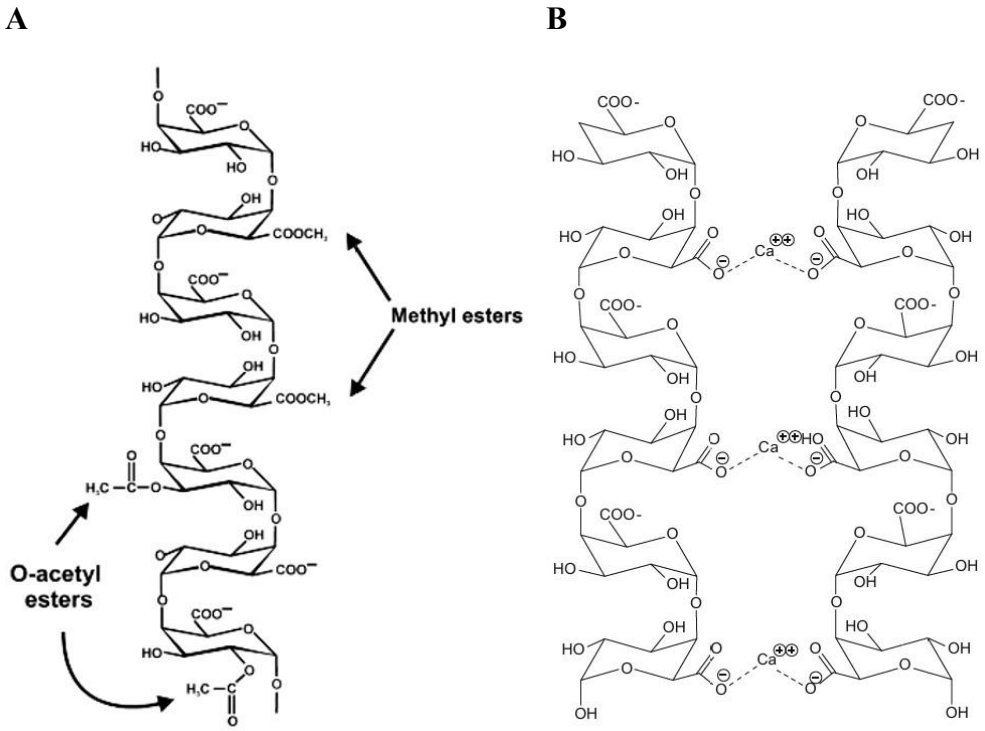


Figure 8 : Représentation schématique de la structure des HGs.

(A) *Représentation de la structure du polysaccharide pectique homogalacturonane (HG) en tant que polymère linéaire de résidus d'acide galacturonique (GalA) liés en α(1,4). Les modifications sont également représentées telles que les sites de méthylation sur le C-6 et d'acétylation sur l'O-2 ou l'O-3.* ***(B)*** *Modèle de réticulation entre deux chaînes d'HG par « egg-box » (boîte à œufs) avec les liaisons calcium* Ca^{2+}.

(Caffall & Mohnen, 2009)

I.4.4.3. Les Homogalacturonanes (HGs)

Les HGs sont des chaînes linéaires d'acides D-galacturoniques, liés en α(1→4), pouvant être méthylées en C_6 ou acétylées en O_2 et/ou O_3. Les degrés de méthylesterification (DM) et d'acétylation (DA) influencent les propriétés physcio-chimiques et rhéologiques des pectines. Le degré de polymérisation (DP) de la chaine influence également la capacité de liaison intra et inter-chaînes. Chez la plupart des espèces, les HGs sont synthétisés sous forme hautement méthylestérifiée (de l'ordre de 80%) et faiblement acétylée (de l'ordre de 5 à 20% selon les espèces) (Sénéchal et al., 2014 ; Shahin et al., 2023). Les galacturonosyltransferases (GAUT) et les GAUT-like (GATL), de la famille des GlycosylTransferases 8 (GT8), sont responsables de la formation et l'élongation de la chaîne principale des HGs en liant des résidus d'acide galacturoniques (GalA) entre eux (Abdel-Massih et al., 2003 ; A. Nebenführ & L. Andrew Staehelin, 2001). Parmi ces protéines, celles qui ont été reconnues comme les plus actives dans la synthèse des HGs sont GAUT13, GAUT14 et le complexe GAUT1:GAUT7 (Cumming et al., 2005; Ibar & Orellana, 2007). Des modifications chimiques peuvent ensuite avoir lieu sur ces chaînes HGs nouvellement formées, comme présentées en **figure 8 A**, telles que des méthylations produites par des méthyltransférases (PMT, Pectin MethylTransferase), telles que CGR2 et CGR3, sur le carbone C_6, et des acétylations par des O-acétyltransférases (PAT, Pectin O-AcetylTransferase) en position O_2 ou O_3 (Abdel-Massih et al., 2003; Cumming et al., 2005; Ibar & Orellana, 2007; S. J. Kim et al., 2015; Zhong et al., 2024). Les liaisons ioniques formés par les ions calciums dans les structures en boites à œufs, sont présentées en **figure 8 B**.

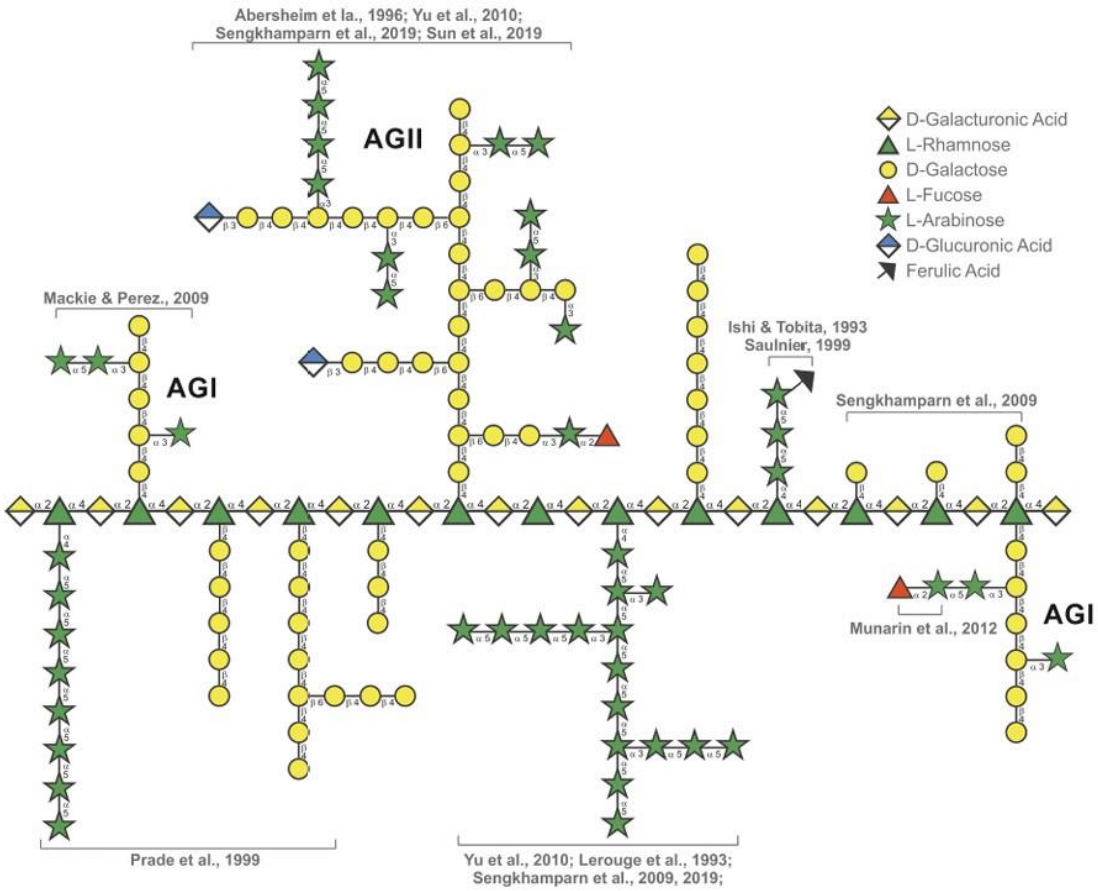


Figure 9 : Représentation schématique de la structure des RG-I.

Présentation de différents types de chaînes latérales des RG-I avec les publications scientifiques dans lesquelles elles ont été présentées. La quantité et l'emplacement des substitutions dépendent fortement des tissus.

(Kaczmarska et al., 2022)

I.4.4.4. Les Rhamnogalacturonanes de type I (RG-I)

Les RG-I ont une chaine principale constituée d'une répétition de dimères d'acides galacturoniques et de rhamnose liés en α(1→4) entre GalA et Rha, puis α(1→2) entre Rha et GalA soit [→4-α-D-GalpA-(1→2)-α-L-Rhap-(1→]. Les RG-I présentent de nombreuses chaines latérales, généralement liées à l'oxygène O-4 du rhamnose, composées d'arabinanes liés en α(1→3) ou α(1→2), de galactanes liés en β(1→4) ou β(1→3), ou d'arabinogalactanes. Les Arabinogalactanes de type I (AG I) forment une chaine ramifiée de α(1→4)-β-D-galactanes avec des substitutions partielles de α-L-arabinanes. Tandis que les arabinogalactanes de type II (AG II) forment une chaine de résidus de galactanes, liés en β(1→3) et substitués en O-6 par des résidus galactose simples ou des courtes chaînes de résidus D-Galp liés en β(1→6), eux-mêmes substitués en O-3, O-4 et/ou O-6 par des Arabinoses (**figure 9**) (Kaczmarska et al., 2022 ; Yapo et al., 2007). Ces chaines latérales peuvent atteindre plusieurs dizaines de résidus, permettant aux RG-I d'avoir une structure très hétérogène et flexible (Round et al., 2010).

La biosynthèse des rhamnogalacturonanes de type I nécessite l'action de nombreuses glycosyltransferases. La chaîne principale de RG-I, est produite par l'action simultanée des enzymes RG-I-galacturonosyltransferase (RGGAT) et des rhamnosyltranferase (RRT), appartenant aux familles GT116 et GT106, respectivement. Les RGGAT catalyse l'ajout de résidus GalA sur un résidu rhamnose en α(1→2) et permet l'élongation de la chaine principale, où suivra l'ajout d'un rhamnose en α(1→4) et ainsi de suite (Amos et al., 2022 ; Wachananawat et al., 2020).

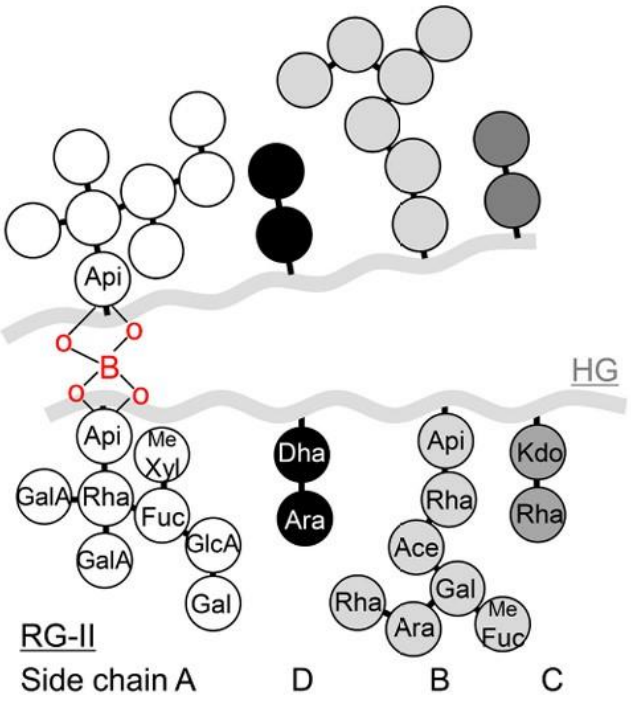


Figure 10 : Représentation schématique de la structure des RG-II et de leur réticulations par le borate.

Le domaine RG-II est constitué d'une chaîne principale de type HG (en gris), substituée par 4 chaînes latérales (A-D). La réticulation de 2 domaires RG-II s'effectue par une liaison borate diester sur les résidus d'Apiose.

**Les lignes grises sont les chaînes principales. Les cercles sont les monosaccharides.*

O : Oxygène. B : Bore. Ace : Acide acérique. Api : Apiose. Ara : Arabinose. Dha : Acide 3-deoxy-D-lyxo-2-heptulosarique. GalA : Acide galacturonique. Kdo : Acide 3-deoxy-D-manno-2- octulosonique. Me Fuc : 2-O-méthyl-fucose. Me Xyl : 2-O-méthyl-xylose.

(Funakawa & Miwa, 2015)

I.4.4.5. Les Rhamnogalacturonanes de type II (RG-II)

Les RG-II ont une chaîne principales composées d'acides galacturoniques, liés en α(1→4). Leurs ramifications ont la particularité de former des motifs comportant jusqu'à 13 sucres différents liés par jusqu'à 20 types de liaisons différentes formant des oligomères très complexes et conservés dans le règne végétal depuis la colonisation terrestre. Ce domaine pectique est absent chez les Chlorophytes et les Charophytes, et leur présence reste putative chez les Bryophytes où ils n'ont pas encore été confirmés (Barnes et al., 2021 ; Hays et al., 2025). Ils peuvent se lier de façon covalente aux homogalacturonanes, et la présence de fragments de RG-I lors de l'étude de RG-II solubilisé pourrait indiquer la proximité de ces deux domaines au sein des pectines de la paroi cellulaire (Ishii & Matsunaga, 2000 ; Pérez et al., 2003). Les substitutions de RG-II, formant des chaînes secondaire de plusieurs sucres et dont la composition a été élucidée par divers travaux, peuvent présenter différents oses. Le rhamnose, le fucose, l'arabinose, le galactose mais également des sucres plus rares comme le 2-O-methyl-fucose et le 2-O-methyl-xylose ont été les premiers à avoir été identifiés. Suivis des acides galacturonique et glucuronique, le 3-C-carboxy-5-deoxy-L-xylose (aceric acid), l'acide 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic (Kdo), l'acide 3-deoxy-D-lyxo-2-heptulosaric (Dha) (Barnes et al., 2021 ; Biswal et al., 2017 ; Hays et al., 2025 ; Pandeirada et al., 2022). La dimérisation de 2 domaines RG-II s'effectue par liaison borate diester sur les résidus d'apiose (**figure 10**) (Funakawa & Miwa, 2015). En effet, le bore, pourtant peu présent dans les tissus végétaux, se retrouve à 90% dans la paroi cellulaire et joue un rôle majeur dans les interactions au sein de la matrice pectique (Matsunaga et al., 2004). La présence d'acide borique est corrélée avec une augmentation de dimérisation des domaines RG-II dans la matrice pectique. Ce qui modifie les caractéristiques rhéologiques de la paroi en améliorant les propriétés mécaniques et l'intégrité de la paroi cellulaire, favorisant aussi bien l'extension cellulaire, que l'adhésion cellulaire, ainsi que les propriétés mécaniques des stomates et la capacité à résister aux stress abiotiques (Liu et al., 2021 ; Panter et al., 2019, 2023 ; Waszczak et al., 2024).

Comme les autres domaines pectiques, les RG-II sont synthétisés dans le Golgi avant d'être secrétés vers la paroi. La chaîne principale des RG-II, similaire aux HG, composée d'un polymère d'acides galacturoniques liés en α(1->4), est produite par les galacturonosyltransferases (GAUT) et les GAUT-like (GATL) (Caffall & Mohnen, 2009 ; Sterling et al., 2006).

Mais des études suggèrent que GAUT4 serait davantage impliquée dans la synthèse de la chaîne principale des RG-II, bien que cela doive encore être confirmé (Hays et al., 2025).

La synthèse des chaines secondaires de RG-II en revanche, nécessiterait au moins 21 glycosyltransferases spécifiques, dont seules quelques-unes ont d'ores et déjà été caractérisées. C'est le cas des RhamnoGalacturonan specific XylosylTransferases (RGXT) qui sont des (1,3)-α-D-xylosyltransferases et qui catalysent le transfert de xylose sur la chaine secondaire à partir d'UDP-α-D-xylose sur le O-methyl-α-L-fucose (Egelund et al., 2006, 2008). Une autre glycosyltransferase spécifique aux RG-II, nommée Cdi, est une galactosyltransferase qui catalyse le transfert du L-galactose sur les fragments RG-II à partir du GDP-L-galactose. Cette protéine, localisée dans le Golgi, a notamment été étudiée dans le tube pollinique et les racines où la mutation du gène codant Cdi entraine un phénotype sévère, voir létal, chez le gamétophyte mâle (Liu et al., 2011 ; Voxeur et al., 2011). Plusieurs autres enzymes responsables de la synthèse des monosaccharides transférés sur les chaines latérales de RG-II ont été identifiées dans le Golgi, comme les UDP-xylose synthases (UXS) et les UDP-glucose 4-epiremases (UGE), catalysant respectivement la synthèse d'UDP-xylose et UDP-galactose (Decker & Kleczkowski, 2019 ; Harper & Bar-Peled, 2002). D'autres enzymes ont été identifiées dans le cytosol, comme les UDP-glucose 6-dehydrogenases (UGDH), les UDP-arabinose mutases (RGP) et les UDP-Apiose/UDP-Xylose synthases (AXS) qui catalysent respectivement la synthèse de UDP D-GlcA, UDP-L-Ara, UDP-D-Api et UDP-D-Xyl (Rautengarten et al., 2011 ; Reboul et al., 2011 ; Zhao et al., 2020). D'autres seraient probablement localisées dans les mitochondries, comme la CMP-Kdo synthetase (CKS) responsable de la synthèse du KDO spécifique des chaînes latérales de RG-II (Kobayashi et al., 2011).

I.4.4.6. Les Xylogalacturonanes (XG)

Les XGs représentent le quatrième et dernier domaine pectique. Ils se trouveraient à proximité des domaines RG-I et participent à la cohésion entre pectines, cellulose et hémicelluloses. La chaine principale d'acides D-galacturoniques, liés en α(1→4) est synthétisée par les GAUT, mais ont la particularité d'être substituées en position O-3 par liaisons β(1→3) par des monomères de β-D-xylose, par des xylosyltransférases (XGD), de la famille GT47. (Jensen et al., 2008). Leur présence varie en fonction des organes de la plante (Zandleven et al., 2007). En immunohistochimie, grâce à l'utilisation de l'anticorps monoclonal LM8, décrit comme étant spécifique à l'épitope des XG, les xylogalacturonanes ont été observés dans les coiffes racinaires chez *Arabidopsis thaliana* par exemple (Willats et al., 2004).

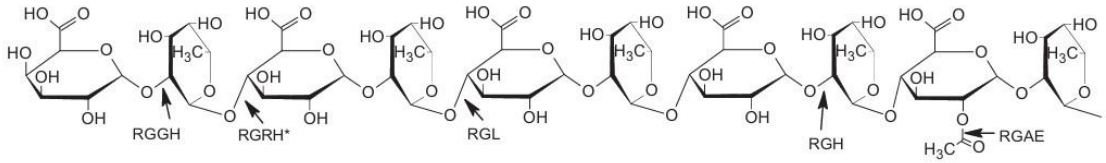


Figure 11 : Représentation schématique de la structure de la chaîne principale des RG-I et des sites d'action des différentes enzymes de dégradation des RG-I.

Sont représentés sur ce schéma les sites d'action des RG-I rhamnohydrolases (RGRH), des RG-I galacturonohydrolases (RGGH), des RG-I endo-lyases (RGL), des RG-I endo-hydrolases (RGH) et des RG-I acetylesterases (RGAE).

(Silva et al., 2016)

CHAPITRE II : LE REMODELAGE DES PECTINES

II.1. Le remodelage des RG-I, RG-II et XG

Le remodelage des pectines dans la paroi cellulaire végétale est un processus complexe essentiel à la croissance, au développement et à la réponse aux stimuli environnementaux des plantes. Il implique des enzymes spécifiques, notamment les pectinases, qui modifient la structure et les propriétés des pectines. Les pectinases forment une large famille d'enzymes spécifiques selon leurs domaines pectiques cibles et leurs modes d'action.

Concernant les rhamnogalacturonanes de type I, ils sont dégradés par des RG-Iases, entraînant une diminution de la viscosité des pectines. Dans l'agroalimentaire, la dégradation des pectines substituées a un effet direct sur le goût et la qualité des jus extraits par exemple (Pan et al., 2023 ; Tapre & Jain, 2014). La dégradation du squelette des RG-I est réalisée grâce à 2 types d'enzymes : 1) les enzymes exo-actives qui comprennent les RG-I galacturonohydrolases (RGGH ; EC 3.2.1.173) clivant la liaison glycosidique α(1→2) entre les D-GalpA et les L-Rhap, à l'extrémité non réductrice pour libérer un résidu D-GalpA et les RG-I rhamnohydrolases (RGRH ; EC 3.2.1.174) clivant la liaison glycosidique entre les L-Rhap et les D-GalpA à l'extrémité non réductrice, libérant un résidu L-Rhap (J. Li et al., 2024; Silva et al., 2016) ;(J. Li et al., 2024; Silva et al., 2016) ;(J. Li et al., 2024; Silva et al., 2016) ; et 2) les enzymes endo-actives, spécifiques aux unités disaccharidiques répétitives (→2)-α-L-Rhap-(1→4)-α-D-GalpA-(1→). Les RG-I hydrolases (RHG, EC 3.2.1.171) appartiennent à la famille GH28 et hydrolysent la liaison entre deux résidus, où l'ajout d'une molécule d'eau rompt la liaison glycosidique. Les RG-I endo-lyases (RGL, EC 4.2.2.23), appartenant à la famille PL4 ou PL11, provoquent la rupture de la liaison glycosidique entre deux résidus par β-élimination, en formant une double liaison dans le résidu ciblé. Les premières enzymes endo-rhamnogalacturonase et endo-lyase identifiées étaient les RhgA et RhgB d'*A. aculeatus*, dont le mode d'action a été caractérisé. L'endo-rhamnogalacturonase RhgA agit préférentiellement en hydrolysant la liaison glycosidique à quatre unités du premier rhamnose non réducteur ; son activité n'est pas entravée par les substitutions de galactose du squelette RG-I. Tandis que l'endo-lyase RhgB agit préférentiellement sur la liaison à quatre ou six résidus de Rhap à l'extrémité réductrice **(figure 11)** (Lemaire et al., 2025 ; J. Li et al., 2024; Lombard et al., 2014 ; Silva et al., 2016).

Leurs chaînes latérales peuvent également être remodelées, principalement par des glycosidases telles que les β-galactosidases, les α-L-arabinofuranosidases et les endo-arabinanases, qui raccourcissent ou éliminent les galactanes et arabinanes portés par le RG-I (Sousa et al., 2015 ; Zheng et al., 2020). Ces modifications participent à la modulation des propriétés physico-chimiques des pectines, notamment leur hydratation, leur flexibilité et leur capacité d'interaction avec d'autres composants pariétaux comme la cellulose et les hémicelluloses. Le remodelage des chaînes latérales influence également l'accessibilité du squelette RG-I aux enzymes ciblant le backbone, telles que les rhamnogalacturonane lyases, et joue un rôle clé dans des processus biologiques comme la croissance cellulaire, la libération du mucilage des graines ou le ramollissement des tissus. Ainsi, la dynamique des chaînes latérales des RG-I constitue un levier central du contrôle structural et fonctionnel de la paroi cellulaire végétale (Huang et al., 2016 ; Jiao et al., 2023 ; Saez-Aguayo & Largo-Gosens, 2022).

Concernant la dégradation des RG-II, leurs chaines latérales très complexes peuvent être dépolymérisées par de nombreuses familles d'enzymes spécifiques, identifiées chez des bactéries et bactéroïdes, telles que des β-glucuronidases (GH2 ; EC 3.2.1.31), des α-xylosidase (GH31 ; EC 3.2.1.177), des α-galacturonidases (GH138 ; EC 3.2.1.67), des β-1,2-apiosidase (GH140 ; EC 3.2.1.188) et bien d'autres compte tenu de la complexité et le grand nombre de types d'oses pouvant être substitués sur les RG-II (Ndeh et al., 2017). Dépourvue de substitutions, sa chaîne principale composés d'acides galacturoniques, peut ensuite être dégradée comme le sont les HG avec des pectine lyases, pectates lyases et les polygalacturonases (voir **II.2.**) (J. Li et al., 2024).

Les XG peuvent être spécifiquement clivés par une famille d'enzymes qui sont les Xylogalacturonan hydrolases (XGH) et qui ont la particularité de cliver entre deux acides galacturoniques xylosylés (Beldman et al., 2003). Des analyses par chromatographie ionique HPAEC (High-Performance Anion-Exchange Chromatography) suggèrent que le résidu xylose lié au GalA reducteur serait lié au O-2 de celui-ci et non au O-3. Des études par spectrométrie de masse MALDI-TOF ont démontré la présence de XG dans la tige et les feuilles d'*Arabidopsis thaliana*. Bien que chez cette espèce, le XG se trouve en bien moins forte concentration que chez des Solanacées comme la tomate (*Solanum lycopersicum*) et la pomme de terre (*Solanum tuberosum*) par exemple. De plus, là où chez les Solanacées,

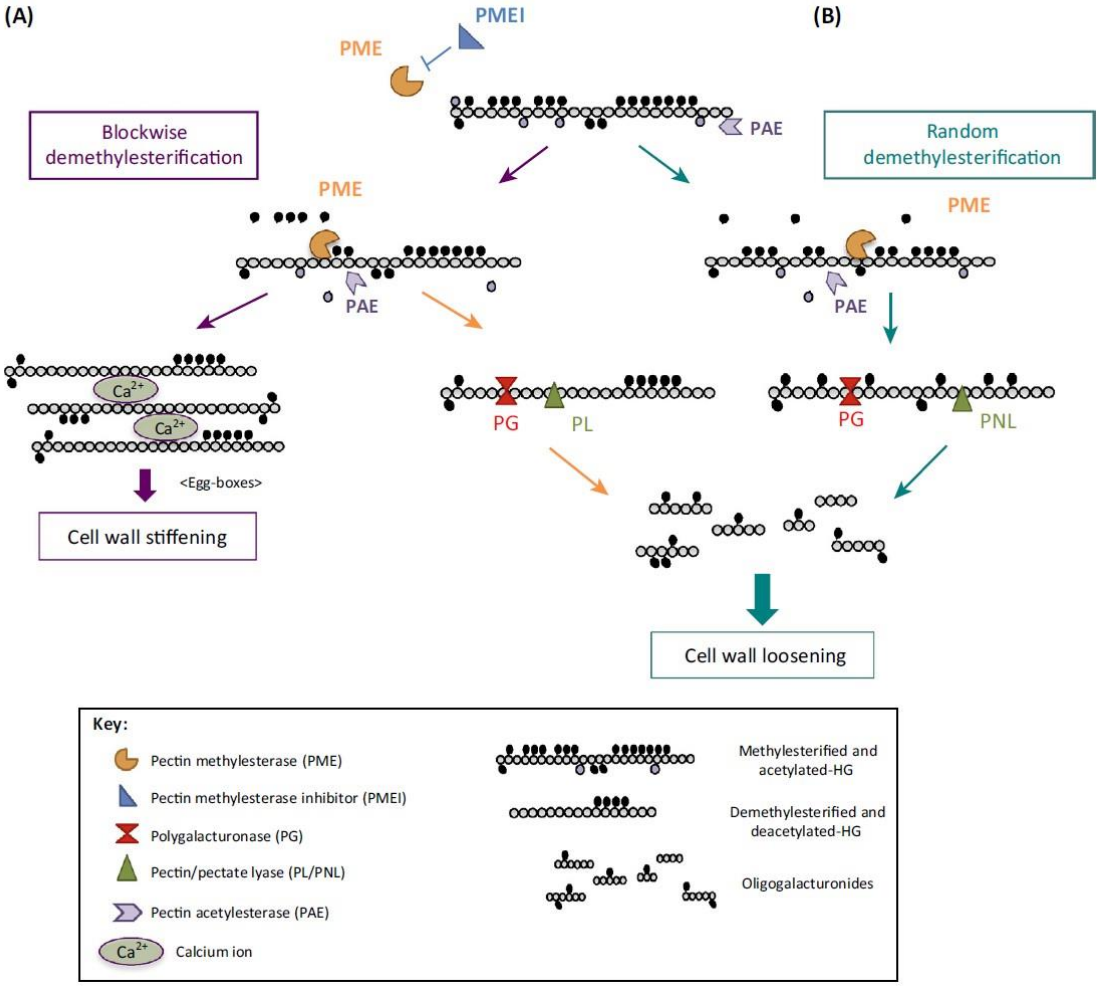


Figure 12 : Représentation schématique des modes d'actions des différentes enzymes modificatrices des homogalacturonanes (HGME).

Les HGs peuvent être méthylestérifiés ou acétylés. Les pectine méthylestérases (PME) peuvent déméthyler les HGs de deux façons différentes. La déméthylation en bloc, ou « blockwise demethylesterification » (A), permet de créer des régions HG déméthylées et chargées négativement, ce qui, par liaison avec des ions calcium Ca^{2+}, provoque la formation de structures en « boîtes à œufs » entre plusieurs chaînes HG. De cette façon, les pectines augmentent leur cohésion, pouvant provoquer la rigidification de la paroi. En revanche, la déméthylation aléatoire des HG par les PME (« random demethylesterification » (B), permet l'action des polygalacturonases (PG) et des pectate lyases (PL), coupant les chaînes HG et produisant des petits fragments, les oligogalacturonides (OGs).

(Hocq et al. 2017)

l'action de XGH libère davantage de disaccharide GalAXyl, la production prédominante de $GalA_3Xyl$ chez *Arabidopsis thaliana* pourrait indiquer que les substitutions en xylose ne sont pas présentes sur tous les GalA (Zandleven et al., 2007).

II.2. Le remodelage des HGs

Le remodelage des pectines, notamment des HGs, est essentiel pour de multiples processus biologiques. Lors du développement cellulaire, le relâchement contrôlé des liaisons pectiques des HGs, donc entre les acides galacturoniques, permet l'élongation cellulaire, facilitant ainsi l'augmentation de la taille des tissus (Peaucelle et al., 2012). De plus, le remodelage des HGs est nécessaire pour adapter la paroi cellulaire aux conditions environnementales changeantes et aux besoins de la plante (Hocq et al., 2017). Il joue également un rôle crucial dans les interactions plantes-pathogènes, en modifiant la composition des pectines pour influencer la réponse de défense des plantes (Lionetti et al., 2012 ; Shin et al., 2021). Dans les cas des pectinases propres aux HGs, les enzymes de modifications des HGs, aussi appelées HGME (homogalacturonan modifying enzyme, **figure 12**), peuvent être classées en deux catégories différentes : les pectinases de modification (pectine méthylesterases, pectine acétylesterases) et les pectinases de clivage (polygalacturonases, pectate lyases et pectine lyases). Tout d'abord, les pectinases de modification contrôlent les propriétés chimiques des HGs, telles que leur degré de méthylation et d'acétylation, influençant ainsi leurs interactions avec d'autres composants de la paroi (Gorelova, 2023 ; Sénéchal et al., 2014). Les pectine méthylesterases (PMEs ; EC 3.1.1.11) et les pectine acétylesterases (PAEs ; EC 3.1.1.6) permettent de dé-esterifier respectivement les groupes méthyle et acétyle des résidus d'acide galacturonique, influençant les propriétés physico-chimiques des pectines (Manmohit Kalia, 2015 ; Philippe et al., 2017 ; Safran et al., 2021)).

Les HGs, notamment leurs zones déméthylés et déacétylés, sont ainsi une cible pour l'action de pectinases de clivage, incluant des polygalacturonases (endo-PGs ; EC 3.2.1.15, et exo-PGs ; EC 3.2.1.67), les pectates Lyases (endo-PLs ; EC 4.2.2.2, et exo-PLs ; EC 4.2.9) et les pectine Lyases (endo-PNLs ; EC 4.2.2.10) (S. Liu et al., 2023). Ces différentes familles d'enzymes permettent la rupture de la liaison α-1,4 entre les résidus GalA, permettant ainsi la coupure des chaînes d'HG. Cependant, leurs mécanismes catalytiques diffèrent puisque les PGs

hydrolysent les liaisons glycosidiques α-1,4-galacturonanes à l'aide d'une molécule d'eau, rendant le résidu cible du clivage réducteur, si celui-ci et les résidus voisins sont déméthylés. Tandis que les PLs et les PNLs attaquent les liaisons α-1,4 entre les résidus GalA par β-éliminations, formant une double liaison entre le C_4 et le C_5 du résidu GalA qui devient insaturé. Les PLs agissent sur les régions déméthylées des HGs car elles nécessitent une intéraction électrostatique avec le groupe carboxyle COO^-, alors que les PNLs agissent sur les HGs méthylés (Seyedarabi et al., 2010 ; Van Den Brink & De Vries, 2011 ; Zheng et al., 2012). Suite aux ruptures des liaisons α-1,4 des HGs, la rigidité des pectines et donc de la paroi cellulaire végétale est réduite. Cet assouplissement de la paroi favoriserait la croissance cellulaire. De plus, le processus de dégradation des HGs produit des résidus d'homopolymères de tailles variables de quelques GalA. Ces résidus, appelés oligogalacturonides (OGs), ont pour certains été décrits comme impliqués dans les voies de signalisation des défenses de la plante en cas d'interaction plante-pathogène. D'autres modulent la croissance en inhibant l'action de l'auxine impliqué dans le développement de certains organes de la plante (Anderson & Pelloux, 2025 ; Sénéchal et al., 2017).

II.2.1. Les pectine méthylestérases (PME)

Lors de leur production et transport en direction de la paroi cellulaire, les HGs présentent un fort pourcentage de résidus méthylés (degré de méthylation, DM), qui sera ensuite régulé par l'action des pectine méthylestérases (PMEs ; EC 3.1.1.11 ; Pfam PF01095). Le DM des HGs joue un rôle clé dans la régulation des propriétés mécaniques de la paroi ainsi que dans la croissance et le développement cellulaire. L'hydrolyse des groupements méthyl libère du méthanol et des protons, ayant un rôle dans la signalisation de régulation des pectines et à la baisse du pH conduisant à une acidification locale de la paroi, respectivement. Puis conduit à la formation de groupe carboxyles chargés négativement, permettant notamment la possible formation de liaison ioniques avec le calcium (Pelloux et al., 2007). Les PMEs sont définies comme faisant partie de la huitième famille des carbohydrate esterases (CE8 ; CAZY website, https://www.cazy.org/CE8.html). Le schéma de déméthylation des HGs par les PMEs peut être par blocs, produisant des régions déméthylées successives, pouvant former des ponts calciques, ou bien aléatoire, favorisant l'action des enzymes de dégradation (**figure 12**).

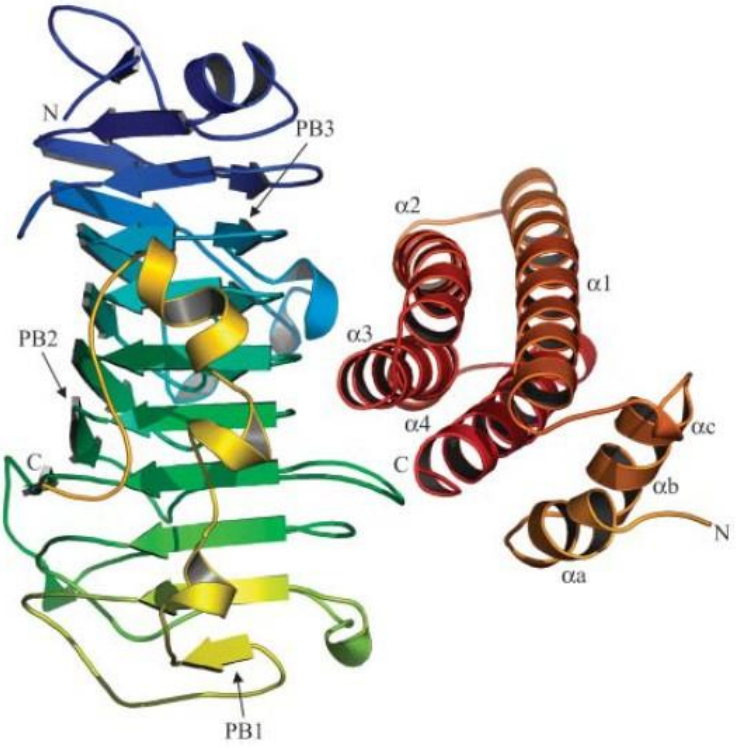


Figure 13 : Représentation en ruban des structures tridimensionnelles de PME de tomate (à gauche) et de PMEI de kiwi (à droite).

Les trois feuillets β des PMEs sont respectivement nommés PB1, PB2 et PB3. Les quatre hélices α de l'inhibiteur PMEI sont nommées α1, α2, α3 et α4, tandis que les hélices de la région d'ancrage N-terminale sont nommées αa, αb et αc. L'hélice α2 du PMEI s'insère au niveau du site actif de PME dans PB3, entravant son accès au substrat (HG).

(Di Matteo et al. 2005)

Il est communément admis que les PMEs végétales déméthylent majoritairement par blocs, tandis que les PMEs d'origine fongique ont plutôt tendance à déméthyler de façon aléatoire les HGs de la paroi cellulaire végétale (Bonnin et al., 2014). Les plantes expriment généralement plusieurs isoformes de PME issues d'une famille multigénique. Ces isoformes varient en termes de masse moléculaire, de spécificité de substrat et de mode d'action. En effet, certaines PMEs ont un mode d'action dépendant du pH apoplastique, comme il a été observé avec AtPME2, processive et déméthylant par blocs à pH7-8, mais qu'elle déméthyle les HG de manière plus aléatoire à pH5 (Hocq et al., 2024). Certaines PMEs ont également été caractérisées chez des animaux arthropodes consommateurs de plantes ; chez certaines bactéries, certains champignons ou encore des oomycètes pathogènes de plantes (Manmohit Kalia, 2015).

Les plantes vasculaires ont des PMEs organisées en pre-pro-protéines. Le domaine PRE permet l'export de la protéine de la cellule vers la paroi cellulaire et est éliminé durant la sécrétion. Il est formé d'un peptide signal (SP) et d'un domaine transmembranaire (TM). Toutes les PMEs n'ont pas ces deux motifs, certaines ne possèdent que l'un des deux, d'autres n'en présentent aucun. Le domaine PRO, quant à lui, est une extension en N-terminal de la protéine, qui est variable en taille et en point isoélectrique (pI), selon les différentes isoformes de PME (Al-Qsous et al., 2004 ; Bosch et al., 2005 ; Markovič & Janeček, 2004). Les PMEs peuvent ainsi être classées en deux catégories, les PME de groupe 1 qui possèdent uniquement le domaine catalytique PME, donc sans domaine PRO et ont cinq ou six introns ; tandis que les PMEs de groupe 2 possèdent 1 à 3 domaines PRO et deux ou trois introns. La présence du domaine PRO influe directement la taille des protéines, puisque les PMEs de groupe 1 sont composées de 250 à 400 acides aminés (27 à 45 kDa), tandis que les PMEs de groupe 2 sont composées de 500 à 900 acides aminés (52 à 105 kDa). Par ailleurs, les séquences des PMEs de groupe II sont proches des PMEs identifiées dans les organismes phytopathogènes comme par exemple la PME de *Erwinia chrysanthemi* (Micheli, 2001 ; Tian et al., 2006).

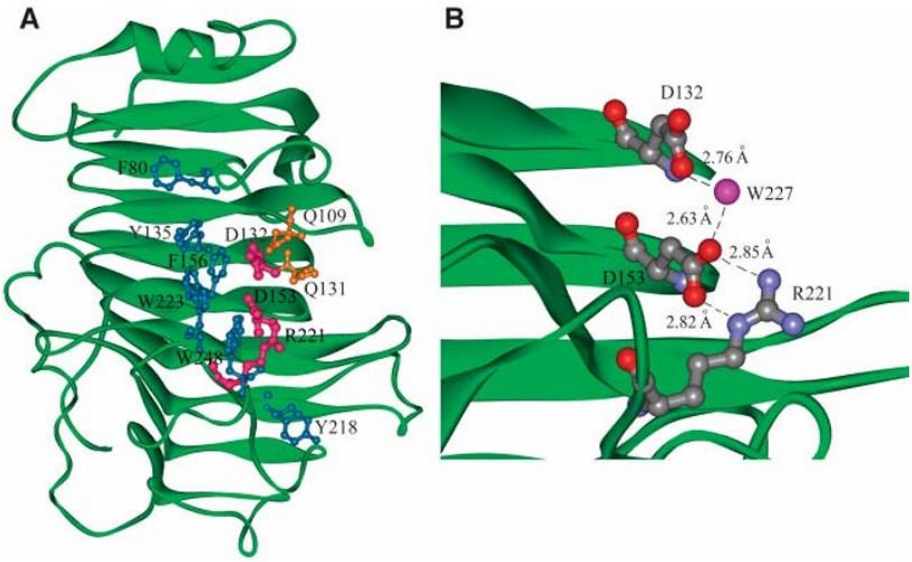


Figure 14 : Représentation tridimensionnelle de la PME de tomate et de son site actif.

(A) *Structure de la PME de tomate et présentation en bâtons des résidus impliqués dans la catalyse (violet), la stabilisation de l'intermédiaire catalytique (orange) et dans la liaison du substrat (bleu).* ***(B)*** *Vue rapprochée représentant les résidus d'acides aminés impliqués dans la catalyse.*

**F : Phe (Phénylalanine). Q : Gln (Glutamine). D : Asp (Acide aspartique). Y : Tyr (Tyrosine). R : Arg (Arginine).*

(Di Matteo, 2005)

Les motifs conservés des PME végétales ont été largement documentés dans la littérature scientifique. Les analyses de séquences montrent que toutes les PMEs possèdent un domaine catalytique PME (PF01095) comportant plusieurs motifs conservés, essentiels à la reconnaissance du substrat et à l'activité enzymatique. Parmi les motifs les plus cités figurent **QAVAL, QDTL, DFIFG et LGRPW** (Markovič & Janeček, 2004). Concernant les structures tridimensionnelles des PMEs **(figure 13)**, il a été observé en étudiant PME-1 de tomate (*Solanum lycopersicum*), la présence d'une β-hélice constituée de sept circonvolutions – ou « spires » - chacune composée de trois feuillets β parallèles notés PB1, PB2 et PB3. Chaque feuillet β constitue un des trois côtés de la protéine et est composé de brins β parallèles. La région N-terminale de la protéine est composée d'une hélice α suivie d'un brin β et est alignée sur PB1. Tandis que la région C-terminale forme une longue queue à quelques courtes hélices α ; au nombre de quatre dans le cas de PME-1 de tomate. Enfin, le site actif se trouve sur le PB3. De nombreux résidus aromatiques bien conservés entre les PMEs seraient impliqués dans la liaison avec le substrat, tels que Tyr135, Phe156 et Trp223 de PME-1 de la tomate par exemple (Manmohit Kalia, 2015). Les structures des complexes de Michaelis d'une PME bactérienne d'*Erwinia chrysanthemi*, dont les analyses ont été effectuées suite à l'action de la PME sur des hexagalacturonates méthylés, suggèrent que les résidus conservés Asp199, Asp178 et Gln177 participent au mécanisme réactionnel (Fries et al., 2007). Chez la PME-1 de tomate, la comparaison avec le mécanisme réactionnel d'*Erwinia chrysanthemi*, a permis de montrer que la réaction se produit comme suit : Asp153, polarisé par la proximité d'Arg221, effectue une attaque nucléophile sur le groupe carboxyméthyle du substrat. Deux glutamines Gln109 et Gln131 stabilisent l'intermédiaire anionique formé. Asp132 agit probablement comme un donneur de proton lors du clivage, là où le méthanol est libéré. Enfin, le carboxylate résultant capte un proton d'une molécule d'eau, restaurant le site actif de l'enzyme **(figure 14)** (Fries et al., 2007 ; Johansson et al., 2002 ; Manmohit Kalia, 2015).

L'activité des PMEs est régulée par une famille de protéines inhibitrices, les Pectin MethylEsterases Inhibitors (PMEIs). Les PMEIs appartiennent à la même famille que les invertase inhibitors (INHS), qui jouent un rôle dans la régulation du métabolisme du saccharose chez les plantes à fleurs, soit la famille Pfam (PMEI, PF04043), malgré des enzymes cibles différentes et des voies métaboliques distinctes (Sénéchal et al., 2014 ; Wormit & Usadel, 2018). Les PMEIs sont des protéines dont les structures sont composées d'un peptide signal N-terminal. Elles contiennent aussi quatre hélices α antiparallèles dont la stabilité est assurée par

la présence de cystéines, formant des ponts-disulfures, ainsi qu'une région d'ancrage N-terminale, qui sert de surface de liaison avec la PME, formée de courtes hélices α. Ces protéines interagissent avec les PMEs en formant un complexe stœchiométrique 1:1. Durant cette interaction, le PMEI va couvrir le site actif de la PME, empêchant ainsi la fixation du substrat (HG).

De plus, la région d'ancrage N-terminale du PMEI va interagir avec la région C-terminale de la PME pour stabiliser le complexe PME-PMEI (Camardella et al., 2000 ; Di Matteo et al., 2005 ; Wormit & Usadel, 2018). Par ailleurs, les PMEIs peuvent inhiber plusieurs PMEs différentes et une PME peut être inhibée par plusieurs PMEIs. Chez *Arabidopsis* par exemple, PMEI4 et PMEI9 peuvent interagir avec PME3 et provoquer des conséquences distinctes sur l'élongation du tube pollinique (Hocq, Sénéchal, et al., 2017).

Il est important de noter que les PMEIs d'une espèce végétale peuvent interagir avec et inhiber l'activité PME d'autres végétaux, comme l'exemple de PMEI de kiwi et des PMEs de carotte et de brocoli, ou bien des PMEIs d'*Arabidopsis* avec la PME d'orange (Jolie et al., 2010 ; Sénéchal, L'Enfant, et al., 2015). De plus, les PMEIs semblent être impliqués dans la résistance aux infections fongiques chez la plante en inhibant l'activité des PMEs endogènes (Lionetti et al., 2007). Cependant les PMEIs d'origine végétale n'inhibent pas l'activité des PMEs fongiques ou bactériennes en raison de l'absence des résidus Lys (K) et Arg (R) nécessaires à la formation du complexe. De plus, la structure des PMEs fongiques empêche la bonne insertion de l'hélice α2 de la PMEI pour l'inhibition (Di Matteo et al., 2005).

La régulation des PMEIs est finement coordonnée avec celle des PMEs. Cela peut être dû des régulations transcriptionnelles, qui peuvent être spatiales et temporelles, spécifiques à des organes et leurs phases de croissance. Par exemple, chez *Arapidopsis*, *PMEI6* et *PMEI14* sont spécifiquement exprimés dans les cellules épidermiques des graines et sont régulés par les facteurs de transcription GLABRA2 et MUM1 (MUCILAGE-MODIFIED 1), qui jouent un rôle dans la différenciation de l'enveloppe des graines et dans la production de leur mucilage (Saez-Aguayo et al., 2013). De plus, la localisation spécifique des PMEIs peut être régulée par le trafic vésiculaire, comme par exemple, dans le tube pollinique d'*Arabidopsis*, où PMEI2 est spécifiquement localisé à l'apex grâce à une sécrétion ciblée (Röckel et al., 2008).

L'expression de certains PMEIs peuvent également être régulés par les hormones, comme l'éthylène lors de la maturation de la banane, ou encore certains acides, comme l'acide salicyliquel'acide jasmonique, impliqués dans les voies de signalisation de la défense de la plante chez le blé (Jeong Hong et al., 2010 ; Srivastava et al., 2012). Le pH joue également un rôle important dans le contrôle de l'activité de certaines PMEs par les PMEIs. En fonction de leur pI, les PMEIs agissent selon un spectre de pH optimal. L'efficacité de la formation du complexe entre PMEI7 et PME3 d'*Arabidopsis* varie par exemple entre les pH 5 et 7 (Sénéchal, Mareck, et al., 2015). Tandis que chez le riz (*Oryza sativa*), PMEI28 est plus efficace à pH 8,5 pour former le complexe d'inhibition (Nguyen et al., 2017). Dans un autre exemple, le PMEI de kiwi ne forme plus de complexe avec les PMEs au-dessus du pH6, puis subit une dénaturation au-delà du pH 7,5 suite à la rupture de ses ponts disulfures au sein de la protéine (Bonavita et al., 2016).

Lorsque les acides galacturoniques d'une région de la chaîne HG sont déméthylés, cette région peut subir différentes modifications, selon le nombre de résidus de GalA et donc la taille de la zone déméthylée. Au-delà de 9 résidus GalA déméthylés, des liaisons avec des cations divalents, notamment des ions calcium Ca^{2+}, peuvent se produire et former une structure « boîte à œufs ». Ces structures induisent l'adhésion HG:HG et tendent à augmenter la rigidité de la paroi. Elles renforcent la cohésion des pectines de la paroi cellulaire en agissant comme un ciment ce qui contribue à la stabilité et à la régulation de la texture des tissus végétaux, et pourrait ralentir ou stopper la croissance cellulaire (Derbyshire et al., 2007 ; Jarvis et al., 2003).

II.2.2. Les pectine acétylestérases (PAE)

Les pectine acétylestérases (PAE ; EC 3.1.1.6 ; Pfam PF03283) sont des pectinases identifiées chez les plantes (Philippe et al., 2017), les bactéries (Shevchik & Hugouvieux-Cotte-Pattat, 2003), ainsi que chez les champignons (Bonnin et al., 2008). Elles ont pour rôle d'hydrolyser les liaisons O-acétylées des pectines. Elles hydrolysent spécifiquement les liaisons acétylesters en O2 et O3 des résidus d'acide galacturoniques des HGs et des RG-I. Cette réaction libère de l'acétate et modifie les propriétés physico-chimiques des pectines (Gou et al., 2012). La désacétylation des HGs améliore les propriétés de gélification ainsi que la dégradation des pectines par les pectinases de clivage (Sénéchal et al., 2014). Il a également été montré, à partir de pectinases extraits d'*Aspergillus*, que l'activité des PAEs est augmentée sur

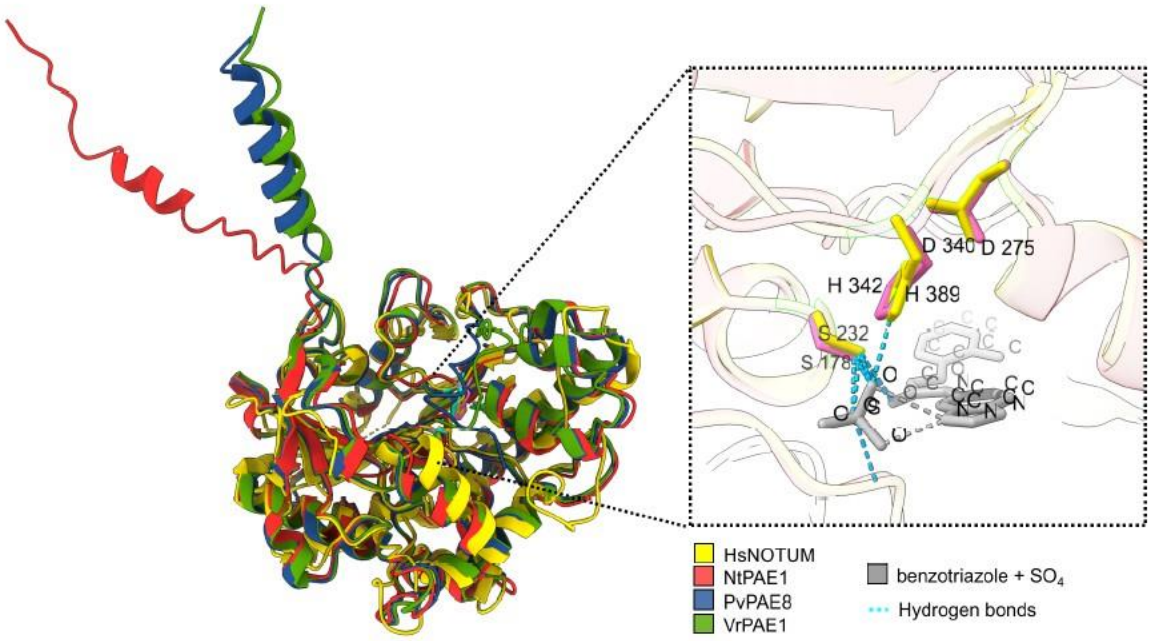


Figure 15 : Représentation tridimensionnelle en ruban de PAEs et NOTUM.

Alignement de structure de HsNOTUM humaine (en jaune), NtPAE1 du tabac (en rouge), PvPAE8 de haricot (en bleu) et VrPAE1 de haricot mungo (en vert). A droite, les résidus du site actif de HsNOTUM (en jaune) et NtPAE1 (en rose). Ceux-ci sont conservés entre toutes ces protéines présentées.

**Hs = Homo sapiens. Nt = Nicotiana tabacum. Pv = Phaseolus vulgaris. Vr = Vigna radiata.*

(Lubini et al. 2023)

des substrats préalablement déméthylestérifiés. Ce qui traduit une probable synergie entre PME et PAE au sein de la paroi cellulaire, facilitant la formation de structures en « boîtes à œufs » ou bien à la dégradation des HGs par des PGs ou des PLs en fonction du mode d'action des PMEs (Oosterveld et al., 2000 ; Sénéchal et al., 2014). Malgré leur fonction, les PAEs semblent être spécifiques des pectines puisqu'elles sont inactives sur les groupes acétyles présents dans d'autres polysaccharides de la paroi, tels que les xyloglucanes, les xylanes et les mannanes (Bonnin et al., 2008). Elles sont également à distinguer des rhamnogalacturonanes acetylesterases (RGAE, EC 3.1.1.86) qui sont des acétylesterases identifées notamment chez certains champignons comme *Aspergillus aculeatus*, comme spécifiques aux RG-I (Mølgaard et al., 2000).

Concernant les motifs de séquence de PAE, des analyses ont été effectuées pour les PAEs d'*Arabidopsis thaliana* pour lesquelles la présence d'un domaine PAE a été identifié sur Pfam (PAE, PF03283) (Philippe et al., 2017). Elles contiennent entre 364 à 444 acides aminés et ont un poids moléculaire prédit compris entre 39 et 49 kDa. Sur la base de leurs séquences, trois clades seraient à distinguer chez *Arabidopsis*. Selon des séquences conservées présentes en C-terminal, on trouve le motif **ERqDTWfaxxS** spécifique au clade 1, **TxxAKAVGrW** spécifique au clade 2 et **TSxRIxNKTIAE** spécifique au clade 3, représentés par AtPAE10, AtPAE8 et AtPAE4 respectivement (Philippe et al., 2017). Egalement, plusieurs PAEs chez *Arabidopsis* possèdent un peptide signal, tandis que d'autres, telles que AtPAE10 et AtPAE12 présentent un domaine GPI (glycosylphosphatidylinositol) qui leur servirait d'ancrage lipidique, probablement à la membrane plasmique.

La comparaison entre des PAEs et une protéine carboxylestérase NOTUM, d'origine humaine, a été effectuée avec les PAE d'*Arabidopsis* afin d'élucider les mécanismes catalytiques de celles-ci. Les alignements de structures de ces protéines sont présentés en **figure 15**. NOTUM étant une protéine classée dans la famille Carbohydrate Esterase (CE) 13 (Kakugawa et al., 2015) tout comme les PAEs de plante sur CAZy, alors que les PAEs d'origine fongiques et RGAE sont classées dans la famille CE12 (Ileperuma et al., 2007 ; Mølgaard et al., 2000). Différents motifs très conservés chez les PAEs ont ainsi été observés chez celles d'*Arabidopsis* suivant les diverses comparaisons. La triade catalytique est composée de sérine (S), d'aspartate (D) et d'histidine (H). D'autres résidus, dont on suppose la présence dans les motifs conservés, tels que **CLDG**, **PxYH** et **GGxwC**, pourraient être impliqués dans la liaison

avec le substrat, en stabilisant la chaîne pectique grâce à des résidus aromatiques et des glycines, stabilisant la charge négative sur l'oxygène O du groupe ester du substrat lors de la réaction.

Le mécanisme catalytique de la triade S-D-H fonctionne en trois étapes. D'abord la sérine est activée par l'histidine en attirant un proton, rendant son oxygène nucléophile. Ensuite, la sérine effectue une attaque nucléophile sur le carbone de l'ester de la pectine, formant un intermédiaire tétraédrique. Les glycines stabilisent alors la charge négative. Enfin, l'aspartate aide à réarranger les charges, puis l'intermédiaire se rompt en libérant l'acide pectique déacétylé et en regénérant le site actif (Kakugawa et al., 2015 ; Kim et al., 2015 ; Mølgaard et al., 2000 ; Philippe et al., 2017).

La désacétylation des pectines peut avoir plusieurs conséquences dues à la modification des propriétés physico-chimiques de ces polysaccharides. L'acétylation des pectines créé une barrière stérique empêchant les pectinases de dépolymériser, donc on pourrait s'attendre à ce que la désacétylation facilite la dégradation des pectines (André-Leroux et al., 2005). Cependant, elle ralentit paradoxalement la digestion par les pectinases microbiennes, ce qui indiquerait que certaines configurations structurales des pectines, y compris le motif d'acétylation, sont nécessaires à l'action de certaines pectinases (Gou et al., 2012). D'autre part, il a été montré que les PAEs jouent un rôle important dans la germination du pollen et dans la croissance du tube pollinique dans la plante de tabac (Lubini et al., 2023). Enfin, l'expression de certains gènes *PAE* peut également être régulée en réponse à différents types de stress. Chez *Arabidopsis*, il a été observé une surexpression d'*AtPAE2* dans le cas d'un stress abiotique, osmotique. L'expression de *AtPAE4* et *AtPAE8* peut être également augmentée, dans de moindres mesures, en cas de stress salin. Par ailleurs, il a été observé dans les tissus reproducteurs des plantes, dans le cas de déacétylation massive provoquée par une activité excessive des PAEs, une augmentation des intéractions des pectines entre elles. Ce qui provoque une réduction de la flexibilité de la paroi, limitant ainsi l'expansion des cellules et ralentissant la germination du pollen (Gou et al., 2012).

De plus, il a été observé que l'expression des gènes *AtPAE4* et *AtPAE2* est augmentée en cas de stress biotique, lors d'une interaction plante-pathogène. Ce qui suggère que les PAEs peuvent aussi bien être impliquées dans les mécanismes de tolérance aux stress abiotique, mais également dans les mécanismes de défense (Philippe et al., 2017).

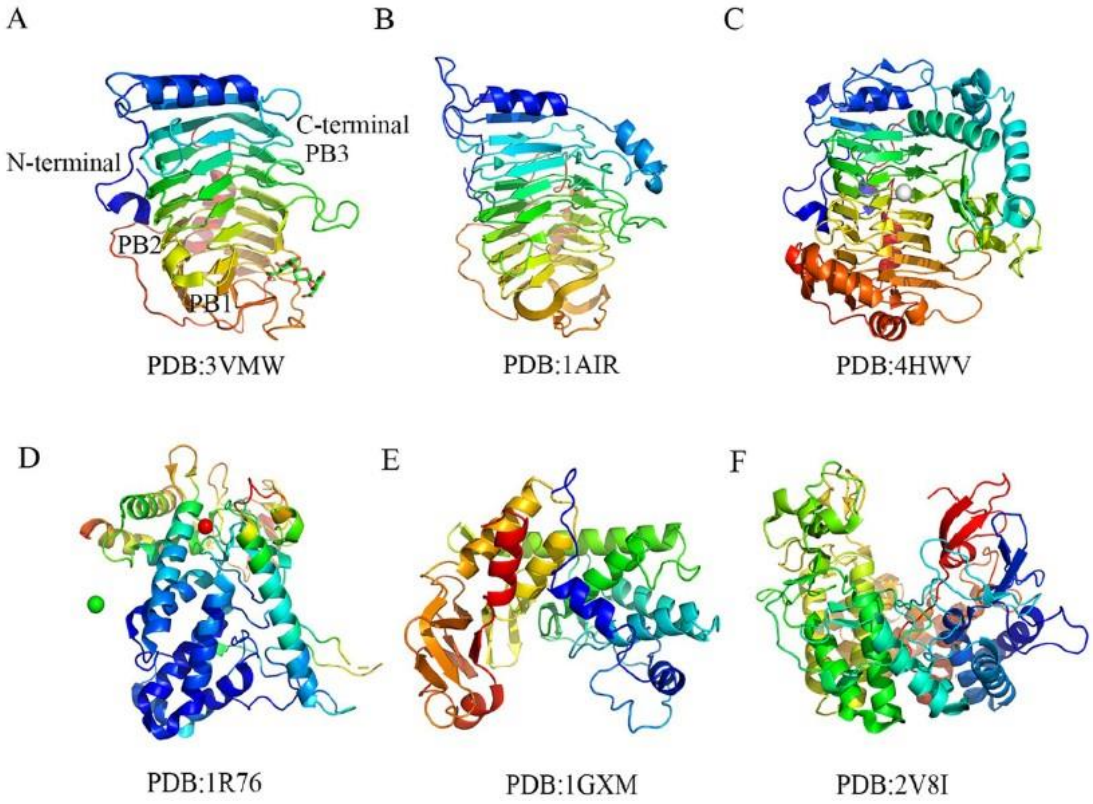


Figure 16 : Représentation en ruban des structure tridimensionnelles de PL de différentes familles CAZy polysaccharide lyases 1 (A, B et C), 10 (D et E) et 2 (F).

Les enzymes de la famille 1 (A, B et C) présentent toutes des hélices α typiques. Les feuillets β sont notés ici PB1, PB2 et PB3 (A). La localisation d'un ion Ca^{2+} est représentée par une sphère blanche sur C. Les enzymes de la famille 10 (D et E) présentent, quant à elles, des structures en tonneau d'hélices α, au nombre de 3. Les sphères verte et rouge représentent les ions chlore et mercure respectivement. Tandis que les enzymes de la famille 2 (F) présentent une structure rare de 7 hélices α.

(Zheng et al., 2021)

Enfin, d'autres protéines, comme les TBL (TRICHOME BIREFRINGENCE-LIKE), notamment TBL38, peuvent présenter une activité d'acétyléstérase sur les HGs, ce qui suggère des rôles additionnels et une hétérogénéité fonctionnelle (Dauphin et al., 2024).

II.2.3. Les pectate/pectine lyases (PL/PNL)

Les lyases pectinolytiques, également appelées transéliminases pectiques, sont réparties en deux familles différentes, les pectate lyases (PL, EC 4.2.2.2 et EC 4.2.2.9) et les pectine lyases (PNL, EC 4.2.2.10) (Gummadi & Kumar, 2005 ; Wu et al., 2020). Les pectate lyases dégradent les pectines de faible degré de méthylation, soit au sein des chaînes pectiques, à l'aide d'un ion comme le Ca^{2+}, et produisant des oligogalacturonanes (Endo-PL, EC 4.2.2.2), soit en agissant à l'extrémité des chaines pour produire des acides digalacturoniques (DP2) (Exo-PL, EC 4.2.2.9). Les pectine lyases quant à elles (PNL, EC, 4.2.2.10) catalysent la dégradation de pectines de haut degré de méthylation, pour générer des oligogalacturonanes méthylés (Yadav et al., 2009). Dans certaines publications, les pectate lyases et les pectines lyases sont également connues sous les noms de polygalacturonate lyase (PGL) et polyméthylgalacturonate lyase (PMGL), respectivement (Tasgin et al., 2020 ; Wang et al., 2009).

Selon leurs séquences en acides aminés, les pectate lyases (PL ou PGL) sont classées dans les différentes familles de polysaccharide lyases 1, 2, 3, 9 et 10 dans la base de données Carbohydrate Active Enzymes (CAZy). Les pectine lyases, quant à elles, sont catégorisées dans la famille polysaccharide lyases 1 (Lombard et al., 2014 ; Zheng et al., 2021). Les pectates lyases d'origine bactérienne ou fongique, donc pathogéniques vis-à-vis de la plante, ont largement été décrites. Des alignements de séquences révèlent que les différents membres d'une même famille présentent en général plus de 50% d'identité et possèdent des structures conservées comme par exemple la position des hélices β chez PelC et PelE d'*Erwinia chrysanthemi*, et Pel de *Bacillus subtilis* (Zheng et al., 2021).

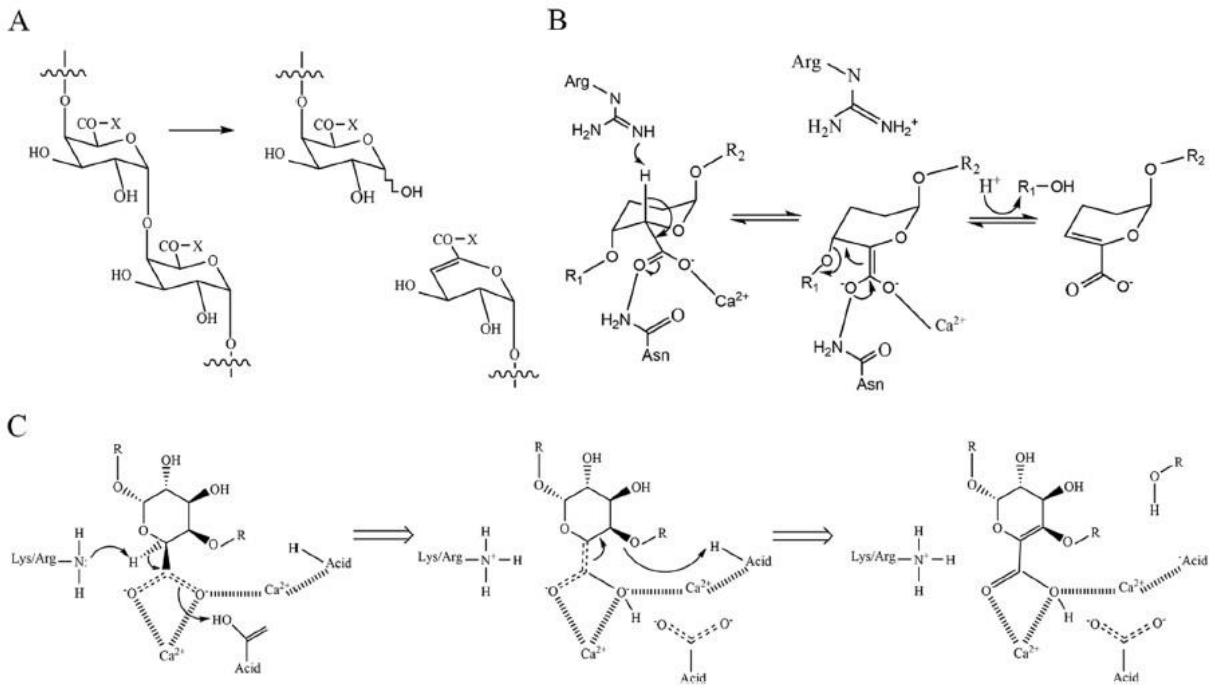


Figure 17 : Représentation du mode d'action par β-élimination catalytique des PL et PNL.

Sur (A) : Représentation du site du clivage -O- sur le substrat, la pectine si X = -O-CH3, avant (à gauche) et après clivage (à droite). (B) Représentation de la catalyse assistée par ion Ca^{2+}. Puis (C) Représentation de l'interaction du résidu responsable de la β-élimination catalytique (Lys/Arg) sur le substrat.

(Zheng et al. 2021)

Dans la famille polysaccharide lyase 1, les PLs partagent une forte identité (98%). La structure de CAB12585.1 (Protein Data Bank, PDB : 1BN8), pectate lyase de *Bacillus subtilis* évoquée précédemment, montre que les résidus Asp223 et Asp227 sont impliqués dans la fixation au calcium Ca^{2+}, tandis que les résidus Lys247 et Arg284 participent à la liaison du substrat. Ces résidus, très conservés dans la famille, correspondent respectivement à Asp244, Asp248, Lys268 et Arg305 dans d'autres PLs comme AAE59748.1 et BAB07538.1, deux pectates lyases d'*Halalkalibacterium halodurans*. Les PLs de la famille polysaccharide lyase 2 ont une identité plus faible, entre 78% et 99%. Il a été observé que dans YePL2A (PDB : 2V8I), de *Yersinia enterocolitica*, les résidus Arg171 et Arg272 sont impliqués dans la catalyse, tandis que les résidus Glu130, Lys132 et Glu515 sont impliqués dans la liaison du substrat et His109, His172 et Glu130 dans la fixation d'ions. Tous ces résidus sont conservés au sein de cette famille. Dans la famille 3, l'identité des PLs est encore plus faible, comprise entre 21 et 78%. Chez BAA87892.1 (PDB : 1EE6) de *Bacillus sp*., Les résidus Asp63, Glu83, Asp84 fixent l'ion calcium Ca^{2+}, tandis que Lys107, Lys129 et Arg132 sont impliqués dans la catalyse. Dans la famille 9, seule PL9A (PDB : 1RU4) de *Dickeya chrysanthemi* est connue. Les résidus Asp209, Asp223, Asp237 fixent l'ion calcium Ca^{2+}. Tandis que Lys237 est responsable de la catalyse. Enfin, au sein de PL10A de *Cellvibrio japonicus* (famille polysaccharide lyases 10), il a été montré que (PDB : 1GXM) le résidu Asp241 semble être lié à la fixation de l'ion tandis que le résidu Arg524, supposé centre catalytique, est stabilisé par Glu535. Parmi ces familles, seules les familles 1, 3 et 9 présentent une structure en hélice β. Tandis que les familles 2 et 10 présentent des structures rares formées de 3 ou 7 hélices α respectivement **(figure 16)** (Zheng et al., 2021).

Concernant leur mode d'action, les PLs et les PNLs agissent sur la liaison glycosidique située à proximité du groupe carboxyle **(figure 17)**. Cette liaison clive en C-4 tandis qu'un atome d'hydrogène est éliminé en C-5, entrainant la formation d'une double liaison C4=C5 non saturée à l'extrémité non réductrice de l'oligogalacturonate nouvellement formé (Q. Tang et al., 2013). Le mécanisme catalytique des PLs implique une neutralisation, par un ion métallique, du groupe d'acide de l'ose adjacent à la liaison clivée. Les ions métalliques facilitant la β-élimination, on distingue deux grands types de mécanismes catalytiques chez les PLs. Tout d'abord, ceux associés aux ions calcium Ca^{2+}, puis ceux associés aux métaux de transition.

On peut également les classer selon la nature de la base catalytique, qu'il s'agisse d'une lysine ou d'une arginine. Dans le cas des PLs à β-élimination assistée par Ca^{2+}, ceux des familles 1, 3, 9 et 10, l'ion calcium contribue à polariser le groupement carboxylate du galacturonate, facilitant la réaction de β-élimination. L'ion forme ainsi un pont entre l'enzyme et le substrat, où les charges négatives du galacturonate interagissent principalement avec l'ion Ca^{2+} (Zheng et al., 2012). Dans la famille 2, d'autres ions métalliques peuvent assister la réaction de β-élimination, tels que l'ion manganèse Mn^{2+} ou l'ion nickel Ni^{2+}. Cependant les interactions site catalytique-ion-substrat semblent différentes des autres PLs étudiées puisque la famille 2 présente des structures à 7 hélices α. Ce mécanisme est encore trop peu connu (Abbott & Boraston, 2007). Enfin, les PLs peuvent également être classées selon le résidu responsable de la réaction catalytique. La première catégorie étant celle où l'arginine est utilisée comme base de Brønsted et l'eau comme acide. L'arginine retire un proton du C5 du substrat, formant un carbanion, un ion carbone chargé négativement, instable. Trois ions Ca^{2+} fixent le substrat pour acidifier les protons et stabiliser les intermédiaires. La famille 1 illustre ce cas avec l'exemple de la PL de *Bacillus subtilis* (G. Ma et al., 2016). L'autre catégorie de PL utilise la lysine comme base de Brønsted, et l'eau comme acide. La lysine retire un proton du C5 puis l'eau acidifiée transmet son proton à l'O4 du substrat. Ce mécanisme nécessite une orientation axiale du H en C5 et de l'OH en C4. Un acide glutamique lie les ions calcium, puis une glutamine stabilise l'O4. La famille 3 illustre ce cas avec l'exemple de la PL de *Caldicellulosiruptor bescii* (Zheng et al., 2021).

De part leurs actions sur la paroi cellulaire végétale, les PLs ont été largement étudiées chez les pathogènes des plantes, responsables de diverses maladies chez les végétaux. Comme c'est le cas pour *Erwinia chrysanthemi*, une bactérie Enterobacteriacaea, qui provoque d'importants dégâts sur des cultures de pomme de terre par exemple (Toth et al., 2011). Certains pathogènes, comme *Verticillium dahliae* et *Alternara brassicicola*, expriment elles-mêmes des PLs, comme VDPEL1 ou PL1332 respectivement, en début de phase d'infection pour faciliter l'extraction de nutriments depuis la plante hôte et augmenter ainsi leur virulence (Cho et al., 2015 ; Yuankun Yang et al., 2018). D'autres pathogènes peuvent moduler la transcription de PL de plantes afin de favoriser l'infection. C'est le cas de *Xanthomonas gardneri*, qui provoque des tâches imbibées d'eau chez la tomate, augmentant l'hygroscopicité de la paroi cellulaire et provoquant une macération locale du fruit, délétère pour celui-ci (Schwartz et al., 2017).

Concernant les PLs exprimées chez les plantes, souvent appelées pectate lyases like (PLL), elles ont été observées chez différentes espèces et jouent divers rôles. Chez *Arabidopsis*, 26 gènes codant des PLs ont été annotés comme s'exprimant dans les fleurs, dont 14 spécifiquement dans le pollen et le pistil (Palusa et al., 2007). Elles auraient pour fonction de réduire la rigidité de l'intine, et de faciliter la digestion des parois durant l'élongation du tube pollinique dans le pistil (Chebli & Geitmann, 2024). Les PLs peuvent également avoir un rôle dans les processus d'abscission, comme dans le cas de la rose où le gène *RbPel1* a été montré comme étant fortement induit par l'éthylène pendant l'abscission des pétales de la fleur (Singh et al., 2011). Durant la maturation des fruits, les PLs jouent un rôle clé dans le remaniement pariétal au même titre que les polygalacturonases (PGs) et les pectine méthylestérases (PMEs). Chez la fraise et la banane, certaines PLs souvent exprimées uniquement dans le fruit, permettent son ramollissement et donc une maturation plus rapide (Jiménez-Bermúdez et al., 2002 ; Marín-Rodríguez et al., 2003). Cette activité durant la maturation des fruits peut également se faire par le biais des *PL* dont l'expression est induite par l'éthylène, comme le cas de *MiPEL1* chez la mangue (Deshpande et al., 2017). Enfin, les PLs endogènes des plantes peuvent avoir également un rôle dans la formation des fibres, comme c'est le cas chez le coton, où plusieurs PLs permettent l'allongement des fibres en dépolymérisant des pectines et donc en assouplissant la paroi cellulaire (H. Wang et al., 2010).

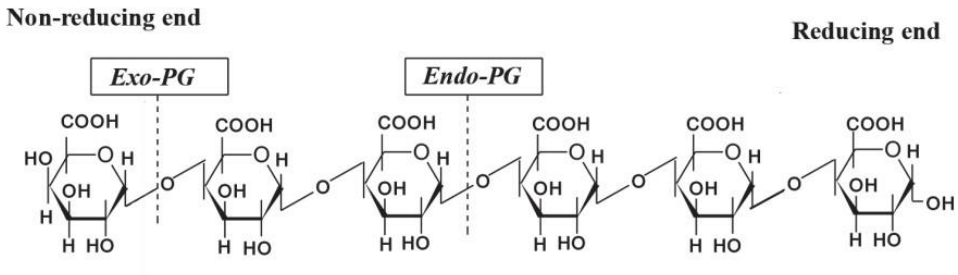


Figure 18 : Représentation des lieux de clivages des endo- et exo-polygalacturonases sur les HGs.

(Abdel-Massih et al., 2003)

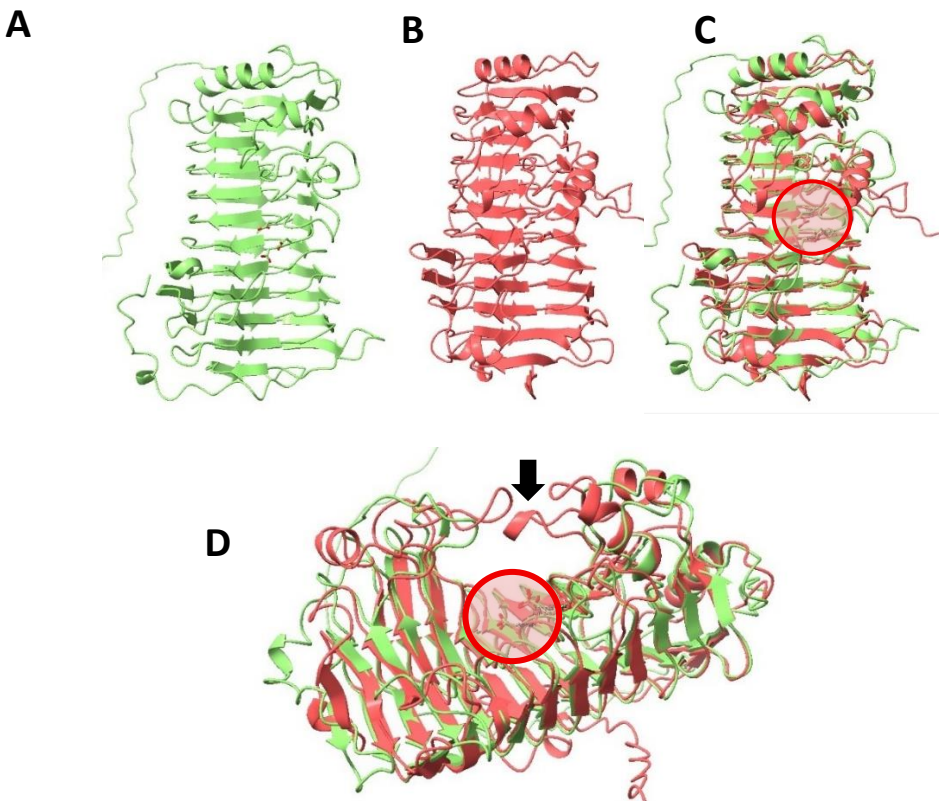


Figure 19 : Comparaison de structures tridimensionnelles entre une endo-polygalacturonase et une exo-polygalacturonase.

Structures tridimensionnelles de PGLR (A), endo-polygalacturonase *d'Arabidopsis thaliana*, et de PGLX1 (B), exo-polygalacturonase d'*Aspergillus nidulans*. Alignements de structures de PGLR (vert) et PGLX1 (rouge) vue de face (C) et de dessous (D). Les triades d'Acides Aspartiques des sites actifs de ces deux protéines sont présentées à l'intérieur des cercles rouges. La flèche noire montre la présence d'une boucle au dessus du site actif de l'exo-polygalacturonase.

II.2.4. Les polygalacturonases (PG)

Les polygalacturonases (PGs), qui sont classées endopolygalacturonases (Endo-PGs; EC 3.2.1.15) ou exopolygalacturonases (Exo-PGs ; EC 3.2.1.82), hydrolysent spécifiquement les liaisons glycosidiques α-1,4 du D-galacturonate des pectines, aux extrémités ou à l'intérieur de la chaîne HG selon leur mode d'action **(figure 18)**, contribuant ainsi à leur dégradation (S. Liu et al., 2023 ; Abdel-Massih et al., 2003). La processivité des PGs se réfère à leur capacité à cliver plusieurs liaisons glycosidiques sans se détacher de leur substrat. Les endo-PGs présentent une certaine processivité en raison de la conformation allongée de leur site actif. Cela leur permet de cliver plusieurs liaisons glycosidiques avant de se désengager, contribuant ainsi au remodelage progressif des pectines. Au contraire, les exo-PGs ne clivent que l'extrémité des chaines polysaccharidiques (Safran et al., 2023).

II.2.4.1. Structure des PGs

Concernant les structures des PGs, ces protéines se replient en un tonneau de feuillets bêta droits, puis présentent un site actif constitué de quatre motifs conservés, qui sont : NTD, DD, GHG et RIK. Le premier motif, NTD (Asn – Thr – Asp), contient le premier acide Aspartique (Asp) du site catalytique et est impliqué dans l'attaque nucléophile sur le carbone du substrat, tandis que l'Asparagine (Asn) et la Thréonine (Thr) servent à positionner l'Asp dans le site actif. Le second motif, DD (Asp – Asp) contient les deux autres acides Aspartiques, le premier servant à stabiliser le nucléophile, tandis que le second agit comme donneur de proton sur l'oxygène sortant de la rupture de la liaison glycosidique α(1→4) du substrat. Le motif GHG (Gly – His – Gly) permet la stabilisation structurelle du site actif. Enfin, le motif RIK (Arg – Ile – Lys) a pour fonction de faciliter l'ancrage électrostatique du substrat. Le site actif se trouve dans une région formant un tunnel. La différence du mode d'action entre les exo-PGs et les endo-PGs réside dans la présence d'une boucle de résidus vers l'extrémité C-terminale, comme présentée sur PGLX1 dans la **figure 19**, formant une poche fermée au-dessus du site actif, limitant l'action de l'exo-PG aux extrémités non réductrices de la chaine HG et libérant des OGs de très faibles DPs, monomères ou dimères et déméthylés (Hocq et al., 2020 ; Safran et al., 2023 ; Voxeur et al., 2019).

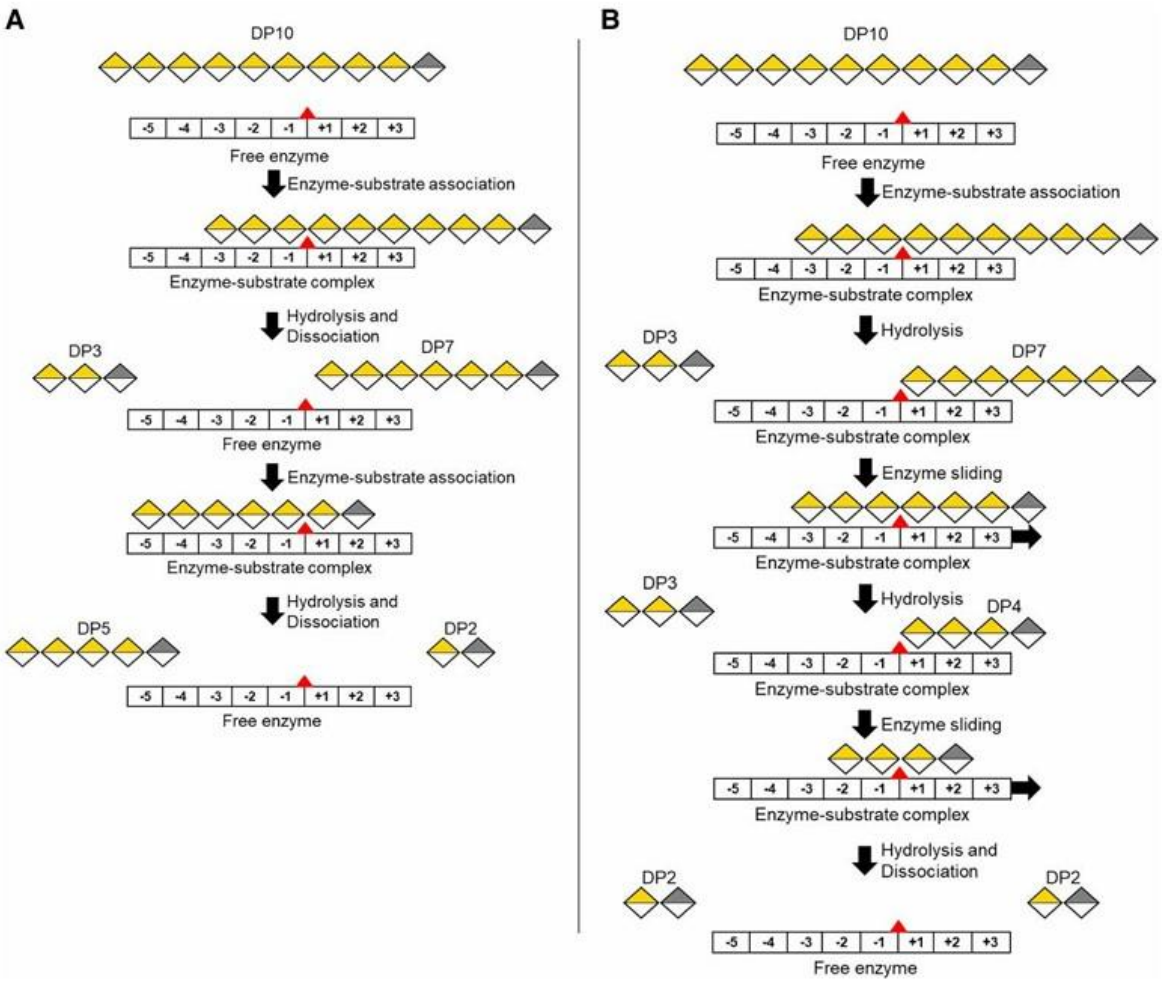


Figure 20 : Schéma de la processivité de PGLR et d'ADPG2.

*PGLR est une endo-PG d'Arabidopsis à faible processivité puisqu'après s'être fixée sur le substrat HG, elle hydrolyse une liaison, puis se dissocie produisant des OGs de tailles variables (**A**). Tandis qu'ADPG2, endo-PG d'Arabidopsis de plus grande processivité car reste fixée sur le substrat, glisse le long de la chaîne HG puis hydrolyse plusieurs liaisons successives, générant ainsi des OGs plus courts (**B**).*

(Safran et al. 2023)

Lors d'études effectuées sur les PGs d'*Arabidopsis thaliana*, il a été observé qu'elles présentent généralement un seul domaine de la famille 28 des glycosyl hydrolase, ou GH28 (Pfam00295). La plupart des isoformes présentent à l'extrémité N-terminale, des motifs prédits de domaines transmembranaires et/ou peptides signaux pour la sécrétion de la protéine en dehors de la cellule, tandis que quelques autres isoformes sont prédites comme étant solubles (Sénéchal et al., 2014). Il existe également des cas à part, comme l'exemple de la protéine PG putative QRT3 (At4g20050) qui ne possède pas de domaine GH28, mais qui possède en revanche un domaine pectate lyase 3 (Pfam12708) et dont l'activité polygalacturonase a été démontrée (Rhee et al., 2003).

II.2.4.2. Mode d'action des PGs

La processivité de ces enzymes, c'est-à-dire leur capacité à catalyser des réactions successives sur le substrat, varie également entre isoformes. Certaines endo-PGs par exemple, hydrolysant dans les zones déméthylées des HG, ont une processivité faible qui se présente comme une association de l'enzyme et du substrat, suivie d'une catalyse et d'une dissociation de l'enzyme avant de répéter le cycle sur une autre zone cible. D'autres PGs ont une dynamique processive forte où, suite à l'association de l'enzyme sur le substrat, celle-ci peut hydrolyser plusieurs résidus successifs en restant liée à la chaine HG jusqu'à sa dissociation en rencontrant une zone non hydrolysable (Safran et al., 2023). Des comparaisons entre PGLR et ADPG2, deux endo-PGs d'*Arabidopsis thaliana*, ont montré des différences dans la composition des sites responsables de la liaison entre l'enzyme et le substrat HG. Par exemple, les résidus D293 et K322 retrouvés chez ADPG2 sont remplacés par T267 et A296 chez PGLR. Des analyses de dynamique moléculaire (Root Mean Square Fluctuation, RMSF) ont montré qu'ADPG2 est globalement plus dynamique que PGLR, lorsqu'elle est associée au substrat, contribuant à une processivité plus élevée. En effet, *in vitro*, les mesures cinétiques des capacités de liaison enzyme-substrat, suggèrent que ADPG2 présenterait une processivité plus importante que PGLR **(figure 20)**. De ce fait, PGLR favoriserait les hydrolyses indépendantes sur le substrat, dans des régions déméthylées, et produit des oligogalacturonides (OGs) plus longs et non méthylés. Tandis qu'ADPG2, plus processive, favoriserait les hydrolyses continues, produisant des OGs plus courts, méthylés ou non. De plus, ADPG2 peut hydrolyser les longs OGs produits par PGLR, suggérant une coopération fonctionnelle possible entre les deux enzymes.

De ce fait, l'action de plusieurs isoformes PGs pourrait permettre de moduler la structure des HGs de la paroi et une régulation fine des processus de développement. Ceci suggère que la diversité des isoformes ne traduit pas une simple redondance fonctionnelle mais plutôt un outil de modulation spatio-temporelle de la structure de la paroi, dépendant de la transcription des différents gènes (Mercadante et al., 2013 ; Safran et al., 2023).

Outre leur action de dégradation, conduisant à une déstructuration de la paroi, l'action des PGs libère des fragments d'oligomères de résidus GalA que l'on appelle des oligogalacturonides (OGs). Ces fragments courts peuvent être impliqués dans différentes voies métaboliques. Le mode d'action des OGs dépend de leur degré de polymérisation (DP) et de leur degré de méthylation (DM) (Ferrari et al., 2013 ; Voxeur et al., 2019). Les OGs agissent comme des signaux moléculaires et jouent un rôle important dans la régulation des réponses cellulaires et des mécanismes de défense des plantes. Les OGs activent des récepteurs de surface, tels que les récepteurs de reconnaissance WAK (Wall-associated kinases), déclenchant des réponses de défense, notamment la production de radicaux oxygénés, d'éthylène et d'autres molécules de signalisation. Ces réponses renforcent la résistance des plantes aux pathogènes et aux stress dans le cas d'OGs de DP 10 à 15 chez *Arabidopsis thaliana* (Davidsson et al., 2017 ; Ferrari et al., 2013 ; Voxeur et al., 2019). Les OGs de faibles DP (3 ou 4) ont un rôle dans l'immunité, la croissance (Davidsson et al., 2017 ; Voxeur et al., 2019) et également dans la skotomorphogénèse (Sinclair et al., 2017). Il a notamment été démontré que les OGs de DP3 ou plus, améliorent les réponses immunitaires et aux stress de la plante, mais réduisent le développement et d'autres voies métaboliques de biosynthèse (Davidsson et al., 2017). Des OGs de DP 4 à 6 ont également été montrés comme éliciteurs de l'induction de l'éthylène, conduisant à la maturation du fruit chez la tomate. D'autres études montrent que des OGs peuvent interférer avec la signalisation auxine en inhibant de façon antagoniste l'activation de certains promoteurs activés par l'auxine (Ferrari et al., 2013). Une étude récente montre que l'application d'OGs issus de pectines de betterave, produits par hydrolyse de pectines avec PGLR et ADPG2, deux protéines d'*Arabidopsis thaliana*, procure une protection partielle du blé contre le *Blumeria graminis tritici* (champignon ascomycète responsable des maladies oïdiums), réduisant les symptômes foliaires de 31%. Les OGs avec un degré de polymérisation plus importants, donc plus longs, allant jusqu'à DP16, induisent l'expression de gènes de défense du blé, tels que *PR1*, *CHI1*, *GLU*, des gènes codants des peroxydases,

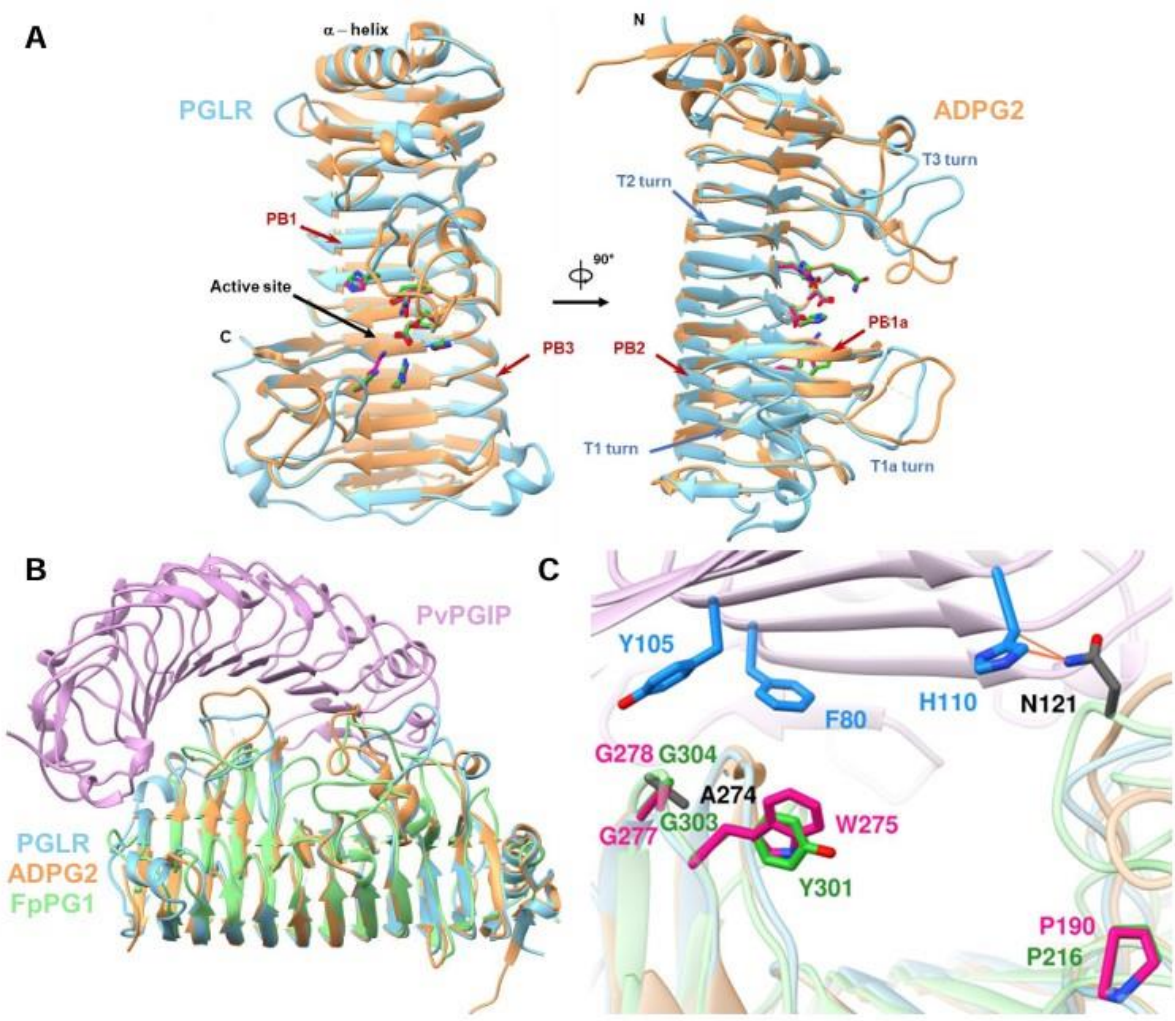


Figure 21 : Représentation tridimensionnelle en ruban de PGs et PGIP.

*Comparaison de la structure de PGLR (en cyan) et d'ADPG2 (en beige), deux endo-PG d'*Arabidopsis thaliana *avec leurs sites actifs et les feuillets β PB1, PB2 et PB3 (**A**). Simulation de l'interaction entre l'inhibiteur PGIP de* Phaseolus vulgaris *PvPGIP (en rose) et PGLR, ADPG2 et FpPG1(PG de* Fusarium phyllophilum*, en vert) (**B**). Identification des résidus clés pour l'interaction entre PvPGIP et FpPG1 (N121 et A274) permettant l'inhibition de la PG par le PGIP (**C**).*

(Safran et al. 2023)

ainsi que *9-LOX*, codant la lipoxygénase 9, impliquée également dans des voies de signalisation d'activation de défenses de la paroi cellulaire végétale. Le degré de polymérisation des OGs influerait donc l'affinité avec les WAK et la capacité à former des structures reconnaissables comme des DAMPs (Carton et al., 2024).

II.2.4.3. Régulation de l'activité des PGs

Les PGs peuvent s'associer avec des PG-inhibiting proteins (PGIPs), empêchant l'interaction des enzymes avec leur substrat. Les gènes codant les PGIPs sont présents uniquement dans le génome des plantes (Kalunke et al., 2015 ; Matteo et al., 2003) et codent des protéines riches en répétitions de leucine (LRR, leucine rich repeat), qui présentent une structure dite en « fer à cheval α/β », c'est-à-dire formée de plusieurs hélices α sur la face extérieure, et des feuillets β sur la face interne. Elles joueraient un rôle dans la protection des plantes contre les polygalacturonases pathogènes (produites par les champignons, les bactéries et même certains insectes phytophages). En effet, l'attaque d'une plante par un pathogène implique notamment que ce dernier produise et sécrète des PGs qui dégradent les pectines de la plante. Les PGIPs, produites par les plantes, permettent d'inhiber l'activité de ces PGs pathogéniques et ont donc un rôle protecteur. L'action de ces PGs produit notamment des OGs de tailles spécifiques, agissant comme des DAMPs. Ceux-ci, reconnus par des récepteurs membranaires spécifiques, activent une transduction de signal induisant la transcription de gènes de défense chez la plante (Kalunke et al., 2015 ; Carton et al., 2025).

Des études structurales semblent montrer pourquoi les PGIPs végétales n'impactent pas l'activité des polygalacturonases endogènes (Safran et al., 2023). Par exemple, il a été montré que PGLR et ADPG2, deux PG *d'Arabidopsis thaliana*, ne possèdent pas dans leur boucle T3 les résidus nécessaires à l'interaction avec PvPGIP2 (S120-N121-S122-N123), contrairement à certaines PG pathogènes, comme FpPG1, une PG de *Fusarium phyllophilum*, un champignon pathogène des plantes (**figure 21**). Parallèlement, AtPGIP1 et AtPGIP2 d'*Arabidopsis* ne présentent pas les résidus (H110 et Q224) nécessaires à l'interaction avec les PG végétales (Ferrari et al., 2003). D'autres PG d'Arabidopsis, comme PGX1, PGX2 et PGX3 semblent également incapables d'interagir avec les PGIPs, notamment à cause de plusieurs conflits stériques, rendant l'association entre les 2 protéines très improbable (Rui et al., 2017).

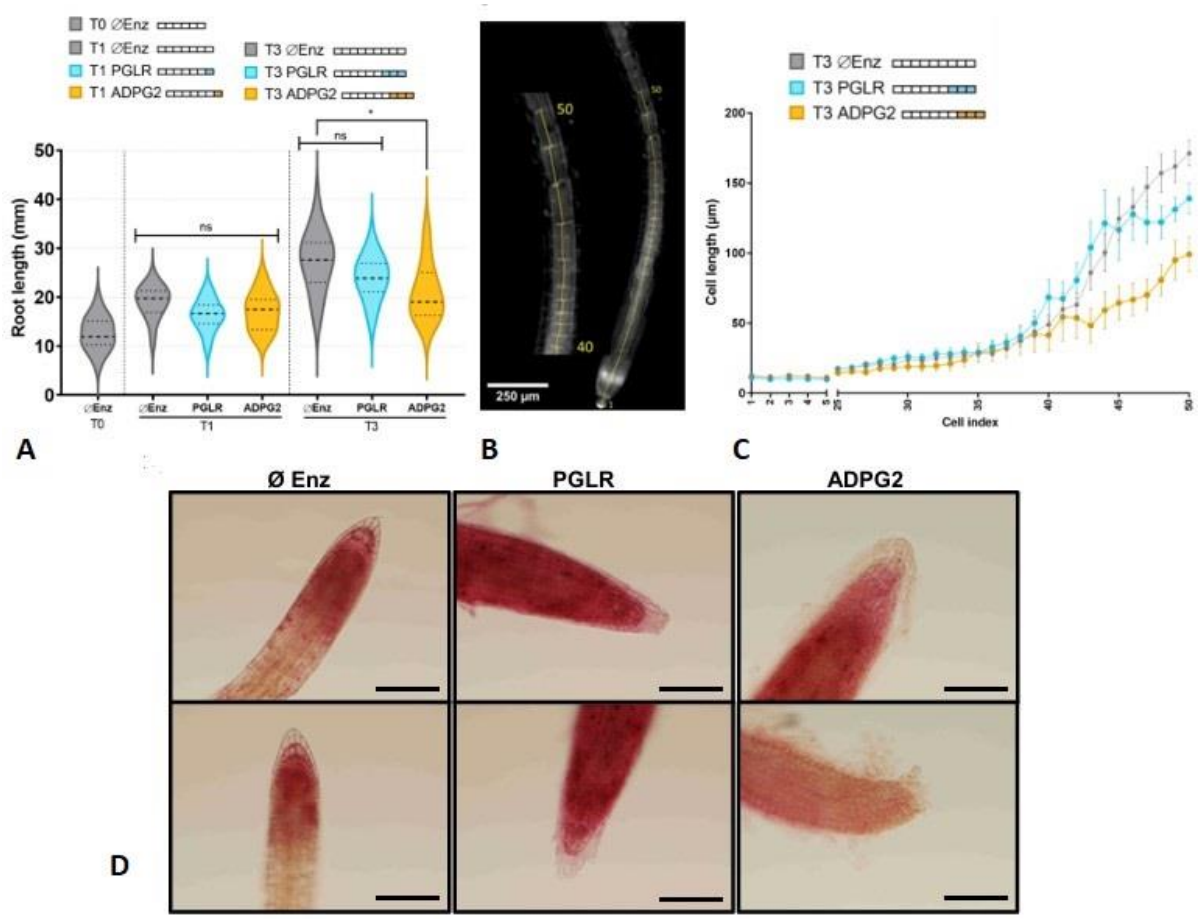


Figure 22 : Activité de PGLR et ADPG2 par application exogène sur *Arabidopsis thaliana*.

*Effets de l'application exogène de PGLR (cyan) et ADPG2 (jaune) sur la longueur des racines selon la durée d'application T1 ou T3 (**A**). Photo d'hypocotyles de lignée EGFP-LTI6b (**B**) ayant servi à la mesure des cellules d'hypocotyle J+7 après application exogène (**C**). Photos de coiffes racinaires colorées au rouge de ruthénium après application exogène (**D**).*

(Safran et al., 2023)

Il semble donc que chez les plantes, la régulation de l'activité des PGs endogènes de la paroi cellulaire reposerait sur d'autres mécanismes, tels que la différence de processivité entre isoformes (Safran et al., 2023).

Dans la paroi cellulaire, le pH de l'environnement pariétal peut jouer également un rôle dans la régulation de l'activité des PGs, comme pour les PMEs (voir partie II.2.1). Il a déjà été démontré que, *in vitro*, les PGs ont une activité variable en fonction du pH, traduisant la modification de leur processivité en fonction de la distribution des charges disponibles (Safran et al., 2021). De plus, les différentes études réalisées *in vitro* révèlent une activité comprise entre pH4 et 7, comme par exemple AtPGLR ayant une activité optimale à pH4 (Hocq et al., 2020), ou ADPG2 à pH5 (Safran et al., 2023). Par ailleurs, la mutation de résidus proches du site actif de la protéine, par exemple H196K et H237K chez PGLR, où les histidines (H) sont remplacées par des lysines (K), modifie la distribution des charges dans le site actif, réduisant drastiquement l'activité de PGLR. Ces changements de charges affectent la dynamique du substrat lié à l'enzyme, en rigidifiant la chaîne d'HG et en augmentant le nombre de contacts enzyme-substrat. Ceci diminue paradoxalement l'activité de l'enzyme, et perturbe sa processivité. Ainsi, le pH module l'état de protonation de certains résidus, influençant les charges électrostatiques et modifiant la processivité de l'enzyme vis-à-vis de la chaîne HG (Safran et al., 2023).

II.2.4.4. Rôle des PGs dans le développement

L'impact de la processivité des PGs sur le développement a été étudié par application exogène de polygalacturonases, comme PGLR et ADPG2. Ces deux enzymes provoquent des effets distincts sur le développement. Il a en effet été montré que l'application exogène d'ADPG2, hautement processive, réduit significativement l'allongement racinaire, perturbe fortement l'adhésion cellulaire au niveau de la coiffe racinaire et influence la longueur des premières cellules racinaires. Concernant PGLR, ayant une processivité moindre à ADPG2, l'application exogène provoque les mêmes phénotypes mais de manière nettement moins importante (**figure 22**) (Safran et al., 2023). De plus, l'application exogène de PGLR sur des grains de pollen semble altérer la germination et provoque une rupture du tube pollinique, confirmé par l'observation de fuite cytoplasmique et de dépôt de callose, un polysaccharide rigide nécessaire à la réparation de la paroi (Hocq et al., 2020).

Des études fonctionnelles sur *Arabidopsis* ont montré que, lorsqu'une isoforme PG est inactivée, comme dans le cas du mutant *pglr* par exemple, l'organisme compense l'absence d'activité de cette protéine par une surexpression d'autres gènes *PG*. En conséquence, l'augmentation de l'activité PG totale, liée au moins pour partie à la compensation transcriptionnelle permet probablement de maintenir le remodelage des pectines de la paroi malgré l'absence d'une isoforme spécifique. Ainsi, bien que chaque isoforme possède des spécificités, telle que la processivité, leur transcription peut être ajustée pour assurer le remodelage des pectines de la paroi dans différents contextes du développement. Ainsi donc, la régulation transcriptionnelle des *PG* constitue une adaptation permettant à la plante de moduler la composition et le remodelage des pectines de la paroi en réponses aux besoins développementaux, telle que la croissance, l'abscission ou le développement de certains organes (Hocq et al., 2020).

D'autres études fonctionnelles ont montré que les PGs agissent sur des processus développementaux. Une étude montre par exemple que l'altération de l'expression de *PGX1*, codant pour une endo-PG d'*Arabidopsis thaliana*, modifie la croissance de l'hypocotyle de la plante. Des lignées surexprimant *PGX1* présentent en effet une élongation cellulaire plus importante dans l'hypocotyle, là où les mutants *pgx1* présentent une élongation cellulaire réduite par rapport au sauvage (Xiao et al., 2014). Par ailleurs, PGX3, une autre endo-PG d'*Arabidopsis thaliana*, a été étudiée dans le cas de la morphogénèse tissulaire ainsi que dans la dynamique stomatique. Les plantes mutantes *pgx3* montrent des altérations morphologiques au niveau de la rosette, une réduction de la longueur des racines, mais également une fermeture stomatale imparfaite. Ce qui relie l'activité enzymatique locale à des changements mécaniques et fonctionnels au niveau des cellules de garde des stomates (Rui et al., 2017).

Par ailleurs, une autre polygalacturonase d'*Arabidopsis thaliana*, QUARTET-3 (QRT3) a été démontrée comme essentielle à la séparation des microspores lors du développement du pollen. Le gène *QRT3* (At4G20050) est exprimé de façon transitoire dans l'anthère au moment où la paroi de la cellule mère du pollen doit être dégradée ; chez les mutants *qrt3*, cette paroi riche en pectines n'est pas correctement hydrolysée, ce qui entraîne la formation de tétrades de pollen (Rhee et al., 2003). L'expression hétérologue de QRT3 confirme une activité hydrolytique sur l'homogalacturonane, en produisant des OGs de différents DP, ce qui suppose

un mode d'action endo-PG. Contrairement à d'autres polygalacturonases d'*Arabidopsis* impliquées dans des processus plus généraux comme l'abscission, la croissance ou le remodelage racinaire (par ex. ADPGs, PGLR), QRT3 se distingue par une fonction hautement spécialisée et strictement développementale, limitée à la reproduction mâle, ainsi que par un profil d'expression et une séquence différente suggérant son appartenance à un sous-classe évolutive présente au sein de la famille des PGs (Rhee et al., 2003).

Enfin, d'autres études ont montré que le polyphenon 60 (PP60) présente un effet inhibiteur sur l'activité des pectine methylestérases (PMEs) et des polygalacturonases (PGs) (Hocq et al., 2020 ; L'Enfant et al., 2015). Il s'agit un mélange de catéchines extrait depuis des feuilles de thé vert. Il est notamment composé d'épigallocathéchine gallate (EGCG), d'épigallocatéchine (EGC), d'épicatéchine gallate (ECG) et d'épicatéchine (EC). Il est suggéré que l'usage de PP60 sur du tissu végétal devrait donc inhiber l'activité des PMEs et PGs au sein de la paroi cellulaire. Certaines études ont été faites sur les effets du PP60 sur le développement végétal et semble montrer que l'application exogène de PP60 provoque des modifications morphogéniques, telles que la réduction de la germination et de l'allongement des tubes polliniques chez *Arabidopsis thaliana* (Y. J. Kim et al., 2020). L'application exogène d'EGCG provoque une réduction de l'élongation des racines, ainsi que l'activation compensatoire de voie de signalisation de brassinostéroïdes (BR), chez *Arabidopsis thaliana* également (Wolf et al., 2012).

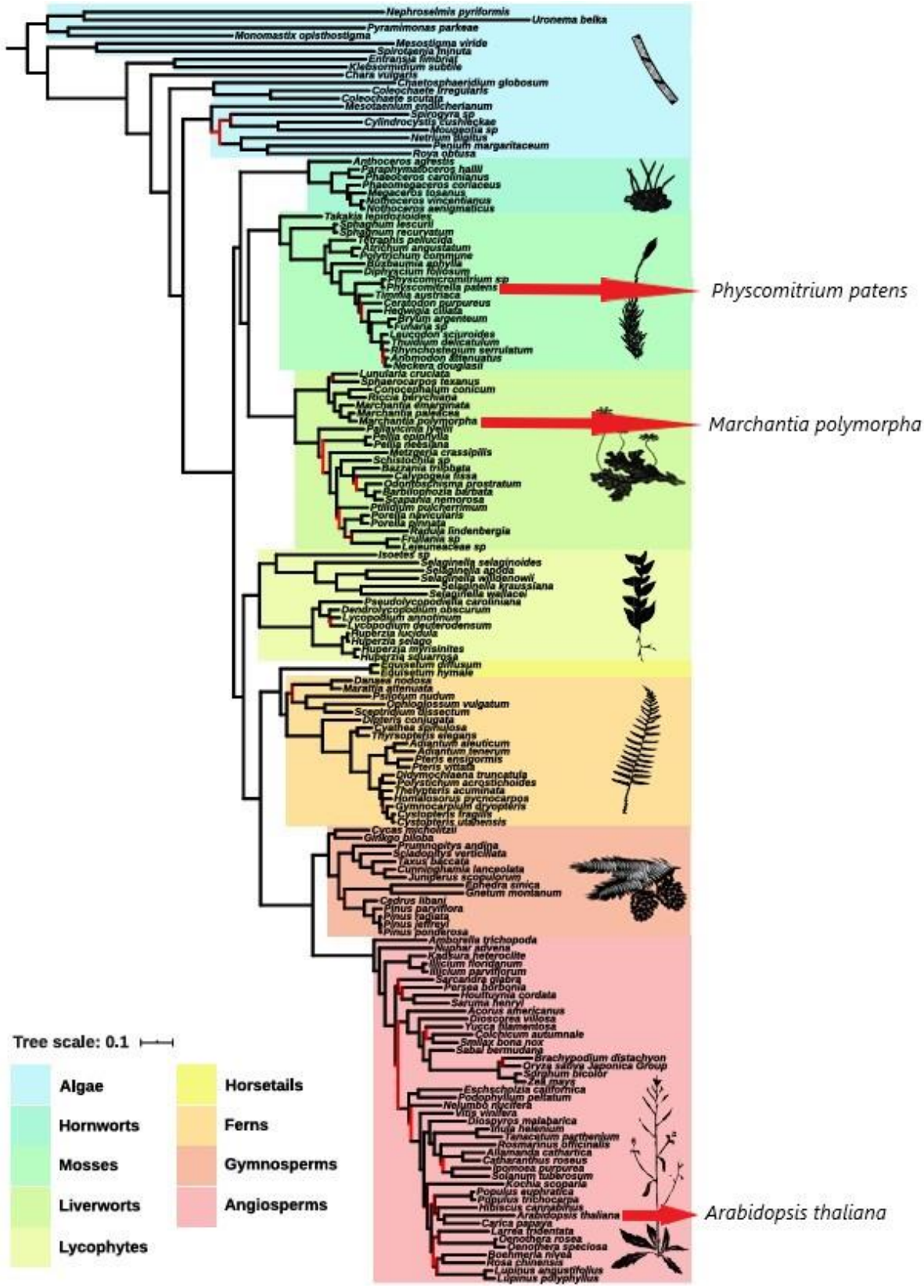


Figure 23 : Arbre phylogénétique des plantes.

(Harris et al., 2020)

CHAPITRE III : LA PAROI DE *PHYSCOMITRIUM PATENS*

III.1. Présentation de *Physcomitrium patens*

III.1.1. Histoire du modèle

Physcomitrium patens, aussi connu en anglais comme « spreading earthmoss », est une plante terrestre non vasculaire, appartenant à la division des bryophytes et plus précisément des mousses (**figure 23**). Les plantes terrestres non vasculaires comprenant trois lignées distinctes : Les hépatiques (Marchantiophyta), les anthocérotes (Anthocerophyta) et les mousses (Bryophyta) (Wickett et al., 2014). *Physcomitrium patens*, autrefois connue sous le nom de *Physcomitrella patens*, est devenue une espèce modèle en biologie végétale. C'est en 1962 que Harold Leslie Keer (H.L.K) Whitehouse, botaniste britannique, collecte un échantillon unique de spore de *P. patens*, dans les bois de Gransden du Huntingdonshire en Angleterre, pour servir de base aux cultures qu'il allait utiliser dans ses recherches. Aujourd'hui, les lignées issues de cette spore, que nous utilisons également dans nos recherches, sont appelées lignées « Gransden ». Entre les années 1960 et 1980, cette mousse fut surtout utilisée comme système génétique pour isoler et analyser des mutants liés à des processus fondamentaux tels que la morphologie des plantes, la biologie hormonale, la nutrition ou encore les mécanismes de réponse à la gravité (Rensing et al., 2020). Des travaux sur *P. patens* consacrés aux phytohormones ont révélé que l'acide abscissique, une hormone essentielle impliquée, chez les végétaux, dans le développement, la croissance, l'adaptation aux stress et d'autres mécanismes, était conservée tout au long de l'évolution des plantes terrestres. Ce qui fit de *P. patens* un organisme clé pour retracer l'histoire évolutive des mécanismes de régulation végétale (Richardt et al., 2010). C'est en 1997 que Schaefer et Zryd ont montré que le ciblage génique par recombinaison homologue est possible chez cette mousse, ouvrant la voie à la génération rapide de mutants et renforçant le statut de modèle de *P. patens* dans la recherche en biologie végétale. Puis, avec le développement des techniques et les premières analyses transcriptomiques, *P. patens* fut retenue pour le séquençage de l'intégralité de son génome, en raison de sa position évolutive particulière et des nombreuses recherches de divers domaines de la biologie végétale émergents sur ce modèle (Cove, 2005 ; Frank et al., 2005 ; S. Rensing et al., 2002).

III.1.2. Systématique et taxonomie

Sur le plan systématique, cet organisme, aujourd'hui intégré dans le genre *Physcomitrium*, appartient à la famille des Funariaceae, au sein de l'ordre des Funariales. Les représentants de ce groupe sont de petites mousses, souvent ramifiées sous l'apex, possédant des organes sexuels et dont le sporophyte produit une capsule, s'ouvrant suite à la perte d'un opercule et entourée de dents de péristome. Cependant, Physcomitrium se distingue des autres membres de ce groupe, puisqu'elle ne possède ni péristome, ni ligne de déhiscence différenciée dans le sporange. Elle représente donc un membre dérivé de cette famille, apparu il y a dix millions d'années (Beike et al., 2014 ; Medina et al., 2019). C'est pourquoi, d'abord classée dans le genre Phascum, aujourd'hui Tortula, puis ensuite transférée au genre Ephereum en 1837, elle devint ensuite l'espèce fondatrice du groupe Physcomitrella, sous la proposition de Bruch et Schimper, avant d'être de nouveau reclassée dans le genre Aphanorrhegma en 1864. C'est seulement grâce à des études phylogénétiques modernes que l'on a démontré que *Physcomitrella patens,* malgré ses quelques différences, ne constituait pourtant pas un genre indépendant, mais provenait en réalité du genre Physcomitrium. Ainsi, toutes les espèces précédemment regroupées dans le groupe Physcomitrella ont été reclassifiées dans le groupe Physcomitrium. *Physcomitrella patens* fut donc renommée *Physcomitrium patens*, ou de son nom complet *Physcomitrium patens* Mitten en référence à William Mitten qui proposa déjà son intégration au groupe *Physcomitrium* en 1851 (Beike et al., 2014 ; Liu et al., 2012 ; Medina et al., 2018, 2019).

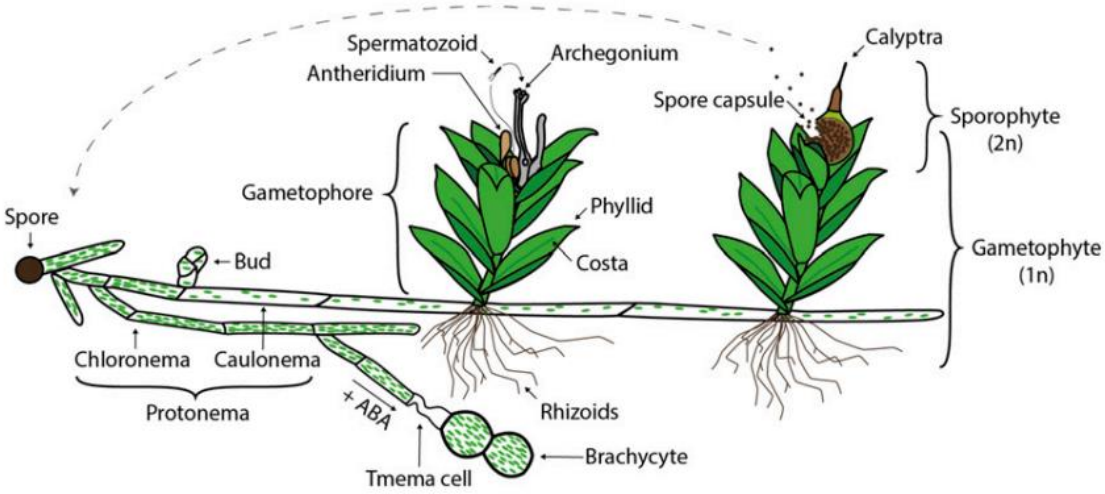


Figure 24 : Schéma du cycle de développement de *Physcomitrium patens*.

(Rensing et al., 2020)

III.1.3. Écologie et géographie

Concernant le plan écologique et sa répartition géographique, *Physcomitrium patens* présente une large distribution dans l'hémisphère Nord. Elle se trouve en Europe, en Amérique du Nord et en Asie de l'Est. D'autres espèces proches ont, quant à elles, une distribution plus diverse. *Physcomitrium raederi*, par exemple, se trouve en Australie, en Amérique du Nord, au Japon et en Europe de l'Ouest. *Physcomitrium magdalenae* se trouve principalement en Afrique équatoriale. Enfin, *Physcomitrium serratum* ne se trouve qu'à l'Est de l'Amérique du Nord. Toutes ces mousses du genre *Physcomitrium* se développent sur les sols humides et éclairés. Elles peuvent être observées le long des chemins de forêts, dans les champs, mais aussi dans des zones très humides comme les plaines alluviales ou près des rizières, mais toujours à basse ou moyenne altitudes (Beike et al., 2014 ; Medina et al., 2015 ; Rensing et al., 2020).

III.1.4. Génétique et génomique

Physcomitrium patens s'est donc imposé comme organisme modèle de choix car il occupe une position phylogénétique clé entre les algues vertes, les chlorophytes, et les plantes vasculaires, les trachéophytes. Son étude permet de retracer des évènements importants de l'évolution des plantes terrestres (Rensing et al., 2020). Son génome a été entièrement séquencé, aussi bien nucléaire, que plastidial et mitochondrial. Ainsi, plus de 30 000 gènes ont été annotés (Lang et al., 2018). Sur le plan génétique, il est facile à manipuler en laboratoire et son haploïdie, sa reproduction majoritairement autogame et son développement rapide facilitent la génération et l'étude de mutations génétiques (Szövényi et al., 2013). Au niveau génomique, les nombreuses données transcriptomiques, obtenues par RNA-seq et microarrays, permettent de relier l'expression génétique et le développement à l'aide des données d'expressions (Hiss et al., 2014 ; Perroud et al., 2018). Au niveau épigénétique, *Physcomitrium patens* présente des particularités comme la préparation de ses tissus protonémaux à la réponse au stress hydrique par des modifications d'histones (Widiez et al., 2014), ou encore une corrélation inverse entre la méthylation génique et les expressions des gènes par rapport aux plantes à fleurs (Lang et al., 2018).

III.1.5. Morphologie et développement

Enfin, sur le plan morphologique et physiologique, *Physcomitrium patens* présente d'abord un cycle de vie haplodiplontique. C'est-à-dire un cycle de développement alternant entre une phase haploïde et une phase diploïde, toutes deux multicellulaires, et où la génération dominante est le gamétophyte haploïde **(figure 24)** (Rensing, 2016).

En effet, les plantes terrestres ont des cycles de développement qui alternent entre les générations gametophytiques et sporophytiques. Comme la plupart des bryophytes, et contrairement aux plantes vasculaires dites trachéophytes, *Physcomitrium* présente un cycle de développement à dominance gamétophytique (Naramoto et al., 2022). Durant sa première phase de développement, à l'issue d'une spore en germination, d'un protoplaste ou de tissu en régénération, *Physcomitrium patens* produit des filaments, les protonemas. Ces filaments présentent deux types cellulaires distincts. D'abord les chloronémas, riches en chloroplastes, qui présentent des cloisons transversales et une croissance apicale lente. Puis les caulonémas, qui sont caractérisés comme ayant moins de chloroplastes, des cloisons obliques, et de croissance apicale plus rapide (de Keijzer et al., 2021). Chaque filament est composé d'une cellule souche à son extrémité, et dont la division se fait sur un plan unique polarisé asymétrique pour l'expansion cellulaire, formant une croissance filamentaire unidimensionnelle. En outre, certaines cellules de protonema peuvent se diviser pour former des branchements latéraux, formant une nouvelle cellule souche qui donnera un nouveau filament et correspond à une croissance dans 2 dimensions. Enfin, les protonemas peuvent également produire des structures plus complexes que de simples filaments, des bourgeons, au sein desquels les cellules se divisent de façon asymétrique, sur trois plans, pour produire les ébauches de feuilles. Ce qui conduit au développement de gamétophores, des structures feuillées de *Physcomitrium patens*. Les gamétophores sont des organes composés d'une tige courte, recouverte de phyllides, des petites feuilles non vascularisées, de formes lancéolées ou oblongues, et de limbe unistratifié sauf dans leur partie médiane, insérées en spirale autour de la tige (Coudert et al., 2017 ; Harrison et al., 2009). Les gamétophores se développant à la verticale sur l'axe anti-gravitropique, constituent la croissance tridimensionnelle de la plante **(figure 25)** (Naramoto et al., 2022 ; Rensing et al., 2020). Le gamétophore adulte porte à son sommet les organes sexuels de *Physcomitrium patens*. Etant une espèce bisexuée, on retrouve aussi bien les gamétanges mâles, nommées anthéridies, et le gamétange femelle, l'archégone, regroupés telle une grappe

en position apicale du gamétophore. Les anthéridies apparaissent d'abord au sommet de la tige du gamétophore, puis la croissance se poursuit avec la formation d'archégones, repositionnant les anthéridies en position axillaire (Hiss et al., 2017 ; Landberg et al., 2013). Les gamètes mâles, aussi appelés spermatozoïdes ou anthérozoïdes, sont biflagellés et nécessitent de l'eau pour nager jusqu'aux archégones. L'oosphère, la cellule reproductrice femelle présente et protégée dans l'archégone, une fois fécondée par les anthérozoïdes, formera le zygote (Karen S. Renzaglia & David J. Garbary, 2001). Le zygote se différencie en embryon, qui évolue en sporophyte. Cet organe, diploïde, est fixé au gamétophore par un pied qui assure les échanges nutritifs. Ce pied, aussi nommé pédicelle, est surmonté d'une capsule sphérique, couverte d'une coiffe, nommée calyptre, qui la protège. A l'intérieur de la capsule, des spores haploïdes sont produites par méïose. Les spores sont ensuite libérées à l'ouverture de la capsule. Ces spores unicellulaires ont une paroi composée de sporopollénine, un polymère protégeant les spores et certains grains de pollen de plantes à graines de la dessication et de la dégradation de nombreuses enzymes par sa composition en longues chaînes d'acides gras (Daku et al., 2016 ; Regmi et al., 2017). Lorsque la spore germe, elle développera des protonémas formant le gamétophyte, redémarrant ainsi le cycle de développement (Hiss et al., 2017 ; Landberg et al., 2013).

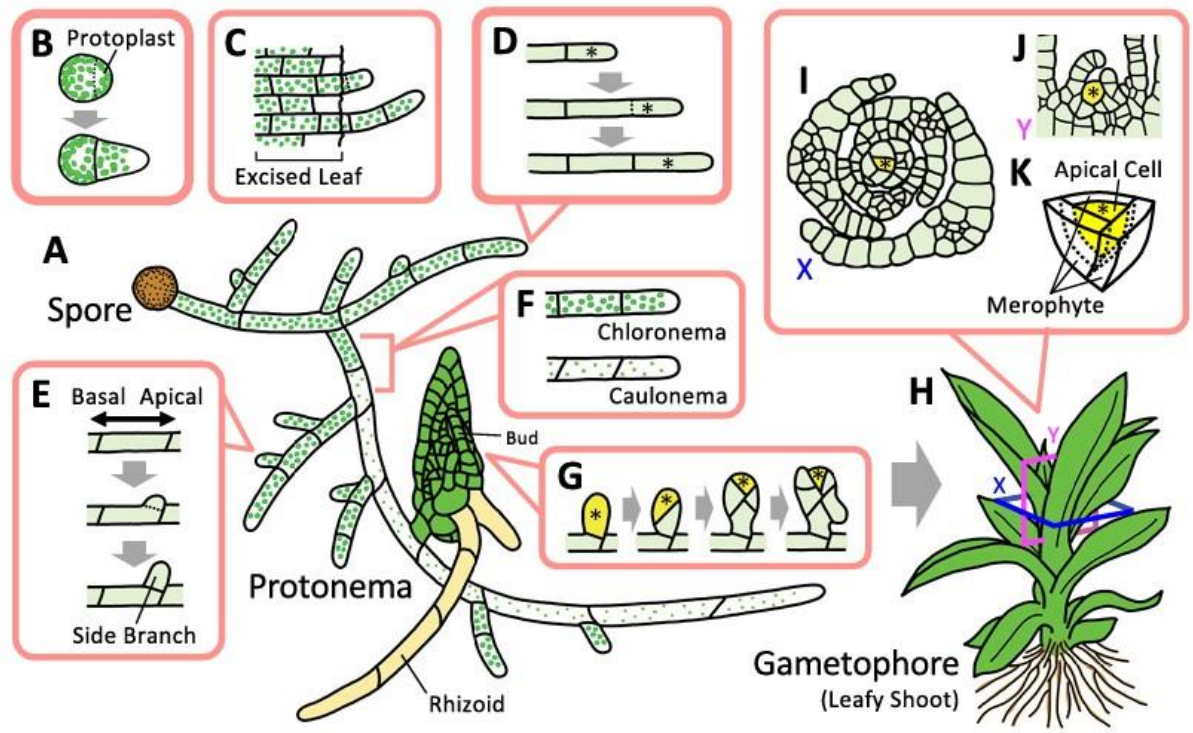


Figure 25 : Schéma du développement du gamétophyte de *Physcomitrium patens*.

*Les protonèmes proviennent de spores **(A)** ou de protoplastes **(B)** et croissent par élongation polarisée et divisions asymétriques des cellules apicales. Ils peuvent aussi se régénérer après un dommage **(C)**. Leur croissance combine allongement apical et ramification latérale **(D, E)**. Au cours du développement, les chloronémas se transforment en caulonémas **(F)**, sur lesquels se forment des bourgeons **(G)**. La formation des bourgeons marque le passage d'une croissance 2D à une croissance 3D, avec l'apparition d'une cellule souche apicale unique dont les divisions conduisent à la formation du gamétophore (tige feuillée) **(H)**. Les tissus produits sont majoritairement simples et constitués d'une seule couche cellulaire **(I, J, K)**.*

(Naramoto et al., 2022)

III.2. Organisme modèle du développement cellulaire

D'après les études phylogénétiques, il semblerait que les trachéophytes et les bryophytes partagent un même ancêtre commun. Etudier les bryophytes permet donc d'en apprendre plus sur la biologie évolutive du développement des plantes. *Physcomitrium patens* et *Marchantia polymorpha*, représentant respectivement les mousses et les hépatiques, sont les deux organismes les plus étudiés comme espèces modèles (Naramoto et al., 2022 ; Rensing et al., 2020). Chez *Physcomitrium*, la transition d'une cellule de chloronema vers une cellule de caulonema est contrôlée par l'auxine et des facteurs de transcription conservés, ce qui reflète une régulation génétique et hormonale analogue à celle observée chez les plantes à fleurs (Thelander et al., 2018). La croissance des protonémas est polarisée, concentrée à l'extrémité des filaments. Le développement se poursuit par la formation de ramifications. Celles-ci naissent à partir de cellules subapicales qui subissent une réorganisation interne, avec déplacement du noyau et du cytosquelette vers le site de future émergence. Ce processus dépend de l'action coordonnée de l'actine, des microtubules et de GTPases spécifiques, appelées ROP (« Rho of Plants », Rho étant une famille de GTPases très conservée chez divers organismes), qui sont reconnues pour leur rôle dans la polarité cellulaire chez les eucaryotes (Cheng et al., 2020 ; Yi & Goshima, 2020). Ainsi, l'étude des ramifications chez la mousse permet de comprendre comment une cellule perçoit son environnement et traduit cette information en réorganisation intracellulaire et en orientation du plan de division.

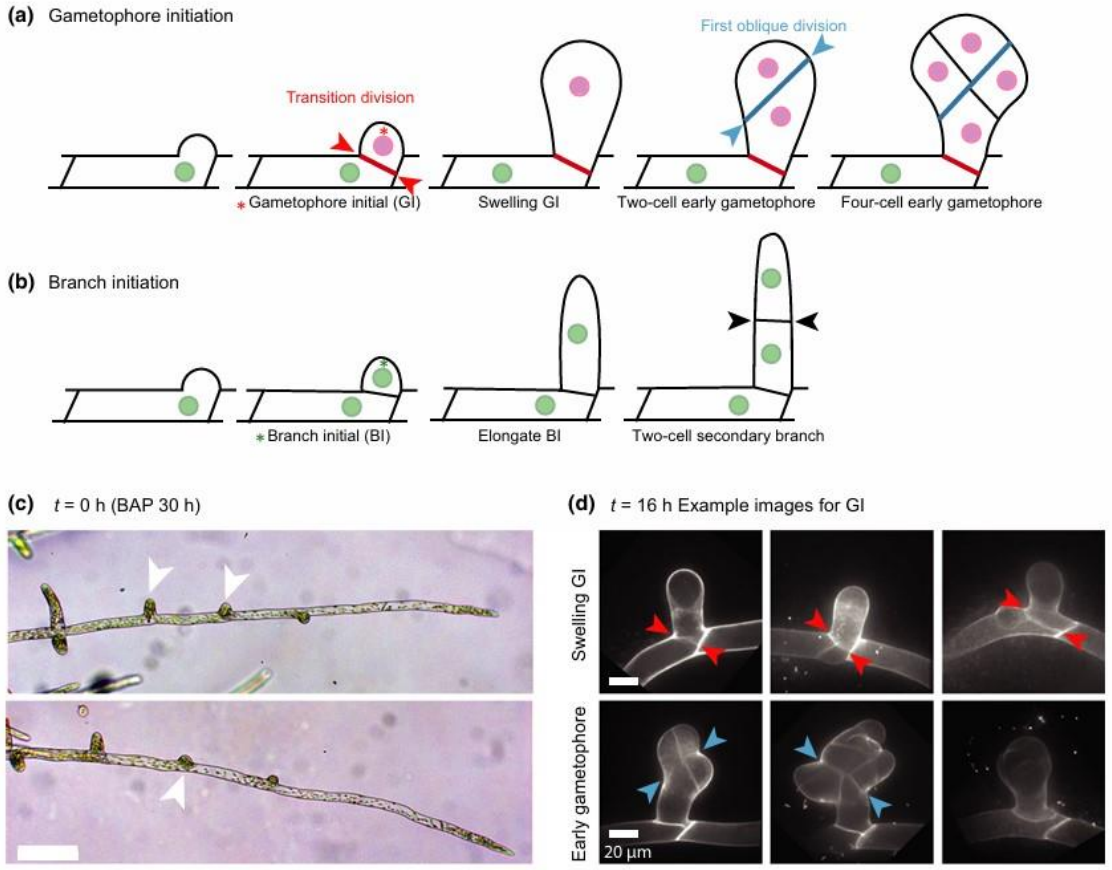


Figure 26 : Formation de bourgeons et de ramifications de *Physcomitrium patens*.

Avant le gonflement, les cellules initiales de gamétophore sont géométriquement distinctes des cellules initiales de branche. ***(A)*** *Schéma illustrant l'initiation du gamétophore, mettant en évidence la division de transition (flèches rouges) séparant la cellule initiale de sa cellule parentale, ainsi que la première division oblique (flèches bleues) observée lors du gonflement.* ***(B)*** *L'initiation des ramifications sur le protonema est caractérisée par des divisions cellulaires perpendiculaires à l'axe de croissance.* ***(C)*** *Des tissus de Physcomitrium patens cultivés pour l'imagerie ont été traités au BAP (6-benzylaminopurine) afin d'induire la formation de gamétophores ; les cellules initiales potentielles ont été identifiées en microscopie (flèches blanches).* ***(D)*** *Images de microscopie des cellules initiales de gamétophore en gonflement et des gamétophores précoces présentant plusieurs divisions, permettant de visualiser la division de transition (flèches rouges) et les premières divisions obliques (flèches bleues).*

(Tang et al., 2020)

Dans le cas des caulonémas, le long de ces filaments, des bourgeons se forment à partir de sous-divisions cellulaires, et marquent la transition vers un mode de croissance tridimensionnel, caractéristique des gamétophores. Ces bourgeons apparaissent d'abord comme une excroissance cellulaire, puis grâce à une série de divisions orientées de façon asymétriques, établissent de nouveaux axes de développement (apical–basal et latéraux) et aboutissent à la formation d'une cellule apicale tétraédrique. Cette cellule, de nature méristématique, est responsable de la croissance continue du gamétophore et de la mise en place de son architecture en trois dimensions. La distinction entre ramification et formation de bourgeon montre l'importance de l'angle et du mode de division dans la morphogenèse de la plante (**figure 26**) (Harrison et al., 2009 ; Kosetsu et al., 2017 ; Tang et al., 2020).

Le cytosquelette joue un rôle important dans le contrôle et l'orientation des divisions cellulaires. Contrairement à la majorité des plantes à fleurs, où la bande préprophasique (BPP) de microtubules joue un rôle clé dans la détermination du plan de division (Vos et al., 2004). *Physcomitrium patens* ne présente pas de BPP au cours des premiers stades de développement, dans les protonémas et lors de la formation de bourgeons. Pourtant, les divisions restent précisément orientées, ce qui indique l'existence de mécanisme alternatifs. Dans ce modèle, les microtubules forment un réseau dynamique réparti dans le cytoplasme, organisé notamment autour du noyau et intégré au cytosquelette, en particulier au niveau des zones de division cellulaire. Ce faisant, ils assurent un contrôle sur les mouvements mécaniques de la cellule, ainsi qu'à la dynamique intracellulaire. Ce mécanisme est peut-être une version ancestrale de la formation de BPP (Harrison et al., 2009 ; Kosetsu et al., 2017).

À l'échelle moléculaire, les protéines ROP et leurs effecteurs, comme l'unique RIC (ROP-Interacting CRIB-containing proteins) présent chez *P. patens*, interviennent dans la polarisation des cellules et l'organisation du cytosquelette (Eklund et al., 2010 ; Li et al., 2017 ; Zhou et al., 2015). Les protéines SOSEKI, récemment identifiées, se localisent de manière polarisée aux coins des cellules et semblent jouer un rôle dans la transition vers la croissance en trois dimensions (van Dop et al., 2020). Par ailleurs, des signaux peptidiques, notamment la famille des CLE (CLAVATA3 / EMBRYO SURROUNDING REGION-related) et leurs récepteurs LRR-RLK, participent à la coordination de la prolifération des cellules souches et à l'orientation des divisions, un mécanisme déjà bien documenté chez les angiospermes et dont

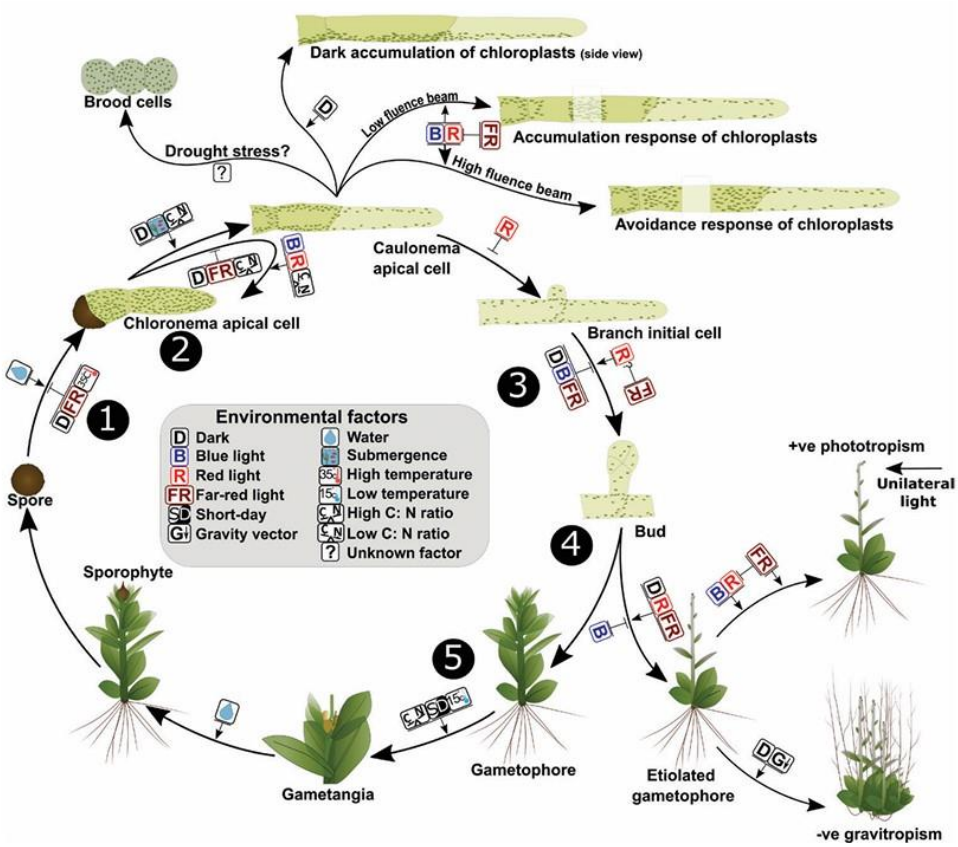


Figure 27 : Cycle de croissance de *P. patens* et influences des facteurs environnementaux.

(1) *La germination des spores, nécessaire à l'établissement du gamétophyte, requiert de l'eau et est inhibée par l'obscurité, la lumière rouge lointaine et les températures élevées.* ***(2)*** *La spore germée forme un chloronéma qui peut se ramifier ou se différencier en caulonéma. Les lumières bleue et rouge favorisent la ramification, tandis que l'obscurité, la lumière rouge lointaine et un rapport Carbone/Azote (C:N) élevé la limitent. Des conditions défavorables peuvent induire la formation de caulonémas à croissance rapide ou de cellules de survie.* ***(3)*** *Les cellules initiales des branches caulonémales peuvent former des chloronémas, des caulonémas ou des bourgeons. La lumière rouge favorise la formation de bourgeons, tandis que l'obscurité, la lumière bleue et rouge lointaine l'inhibent.* ***(4)*** *En conditions optimales, les bourgeons se développent en gamétophores. Certaines conditions lumineuses induisent une étiolation, tandis que la lumière bleue la supprime et contrôle les réponses phototropiques.* ***(5)*** *Enfin, des facteurs comme le photopériodisme court, le froid et un rapport C:N élevé déclenchent la gamétogenèse. L'eau permet la fécondation, conduisant à la formation du sporophyte et à la production de nouvelles spores par méiose.*

(Mohanasundaram & Pandey, 2022)

on retrouve les prémices chez cette mousse (Hirakawa et al., 2019 ; Whitewoods et al., 2020 ; Yamaguchi et al., 2016). Enfin, la transition entre chloronémas et caulonémas, la formation des bourgeons et la polarité cellulaire, est contrôlée par les PIN, dont il existe 3 homologues chez *P. patens*, et qui sont responsables du transport polarisé de l'auxine (Thelander et al., 2018). Les cytokinines, quant à elles, sont impliquées dans l'initiation des bourgeons et interagissent avec les voies de signalisation de l'auxine et des facteurs de transcription APB, impliqués dans l'orientation du plan de division, eux-mêmes régulés par la protéine DEK1 (Defective Kernel1). L'ensemble de ces régulations hormonales et transcriptionnelles illustre la complexité de l'organisation cellulaire dans le développement de la plante (Moody, 2019 ; Moody et al., 2018).

Dans un tout autre contexte, quand les conditions obligent un développement à l'obscurité, les plantes vasculaires concentrent leur métabolisme vers davantage sur l'expansion des hypocotyles au détriment du développement des plastes. Ce processus, la skotomorphogénèse, permet à la plante de se développer plus rapidement en longueur et donc d'augmenter ses chances de trouver de la lumière pour ensuite effectuer la photosynthèse. Ce processus fait opposition à la photomorphogénèse, le développement à la lumière **(figure 27)** (Mohanasundaram & Pandey, 2022). Chez *Physcomitrium patens*, les caulonemas, en absence de lumière mais en présence d'une source de carbone, croissent dans le sens opposé au vecteur gravitropique et portent le nom de caulonema agravitropiques ou skotonemas (Rensing et al., 2020).

Le phénotypage de caulonémas développé à l'obscurité a notamment permis de démontrer que leur croissance est également régulée par les strigolactones (SL) qui réduisent notamment l'élongation cellulaire et la division. Les SL, molécules de signalisation dérivées des caroténoïdes, modulent la morphogénèse des protonémas et influencent la formation de gamétophores (Hoffmann et al., 2014). Chez *Physcomitrium patens*, la perception des SL repose sur les récepteurs PpKAI2L, homologues de KAI2 des plantes à fleurs. Ces récepteurs reconnaissent les SL ou des signaux analogues KAI2-LIKE (KL). Cependant, contrairement aux plantes à fleurs, la transmission du signal SL chez *P. patens* n'implique pas la protéine F-box MAX2. De plus, les régulateurs SMXL ne jouent pas le rôle d'inhibiteurs de la signalisation SL, mais agissent comme régulateurs négatifs dans la voie KL dépendante de MAX2.

En effet, des travaux récents ont montré que la protéine F-box MAX2, ainsi que les protéines SMXL de *P. patens* interviennent spécifiquement dans la signalisation KL, et non dans la voie SL. Pour étudier les fonctions de ces différentes protéines, des mutants ont été générés par recombinaison homologue et par CRISPR-Cas9, ciblant notamment les gènes PpKAI2L et SMXL. L'analyse de ces mutants a permis de relier l'activation ou la perturbation des voies de et KL aux phénotypes observés. Notamment en ce qui concerne la régulation de la croissance des caulonémas (Guillory et al., 2024 ; Lopez-Obando et al., 2021).

Enfin, *Physcomitrium patens* est un excellent modèle pour l'étude de mutants notamment obtenus par recombinaison homologue. Il s'agit ici de générer des mutations knock-out par remplacement du gène cible par exemple, avec une grande précision. Ce modèle fait ainsi l'objet de nombreux travaux détaillant les paramètres de transformation par recombinaison homologue, tels que la longueur des régions d'homologie et la conception de vecteurs de transformation (Kamisugi et al., 2005, 2006). L'atout supplémentaire de *P. patens* dans la production de mutants est son cycle de vie dominé par une phase haploïde, ce qui permet d'observer directement l'effet des mutations, sans avoir besoin de produire des lignées homozygotes contrairement aux plantes à graines (Rensing et al., 2020).

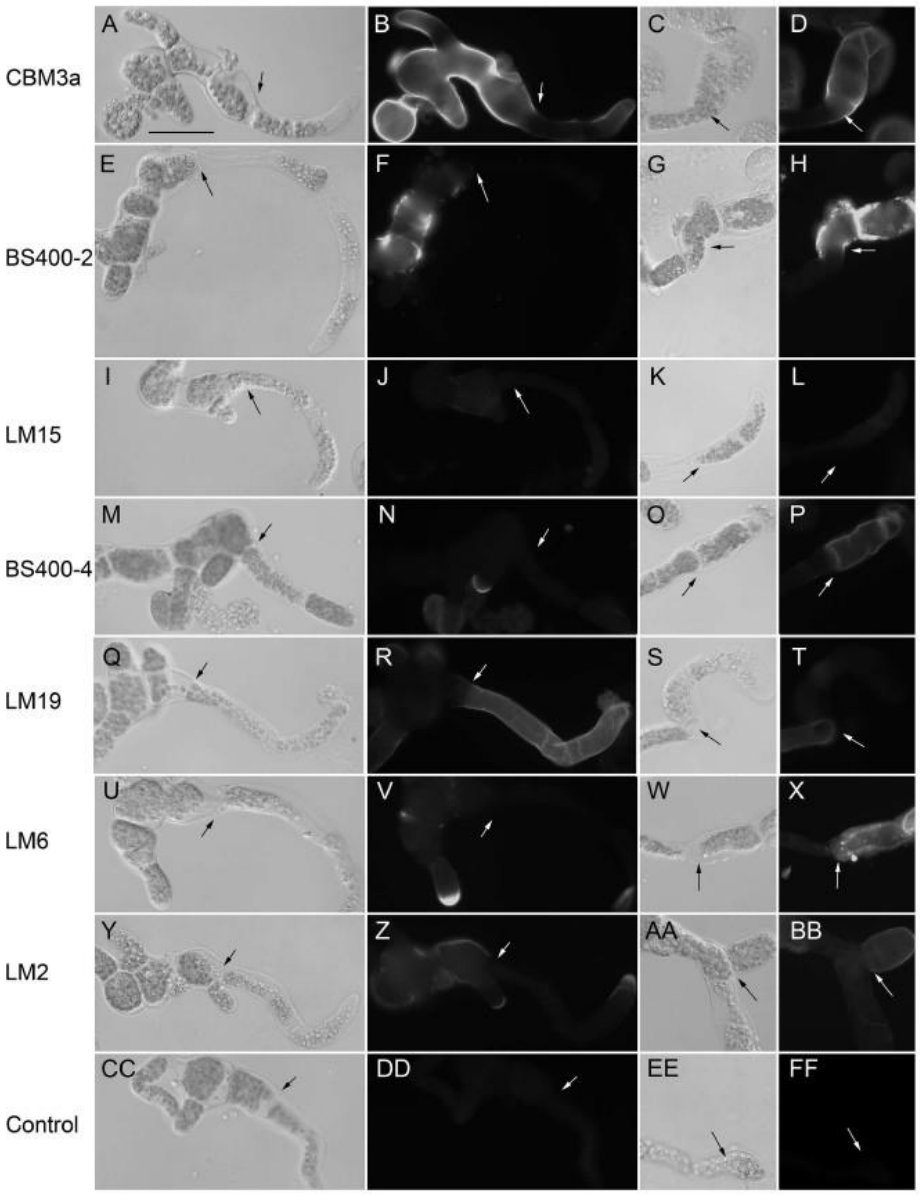


Figure 28 : Photos de protonémas de *Physcomitrium patens* regénérés depuis des protoplastes et marqués par des anticorps ou des CBMs.

Les protoplastes ont regénéré deux jours sur un milieu contenant du mannitol, puis deux jours sur un milieu sans mannitol (colonnes 1 et 2), puis de nouveau deux jours sur mannitol (colonnes 3 et 4). Photos prises par microscopie optique à contraste interférentiel (DIC) (colonnes 1 et 3), et microscopie à fluorescence (colonnes 2 et 4). Marquages : cellulose cristalline (CBM3a), anticorps anti-callose (BS-400-2), anti-xyloglucane (LM15), anti-mannane (BS-400-4), anti-HG (LM19), anti-1,5-α-L-arabinan (LM6), anti-protéine arabinogalactane (LM2), et contrôle. Les flèches indiquent la transition entre les cellules ayant poussés dans le milieu mannitol et hors du milieu mannitol. Echelle à 50 µm.

(Berry et al., 2016)

III.3. La paroi cellulaire de *Physcomitrium patens*

Des études immunohistochimiques, présentées en **figure 28**, ont permis de décrire la composition de la paroi cellulaire de *Physcomitrium patens* et ont montré qu'elle était modulée selon le stade de développement et par les contraintes environnementales, notamment l'osmolarité de l'environnement (Berry et al., 2016).

Tout d'abord, dans les protoplastes en régénération, la paroi nouvellement formée présente une composition majoritairement cellulosique (sonde CBM3a). De plus, des dépôts significatifs de callose (BS 400-2) ont été observés, surtout au niveau des plaques de division, ce qui a déjà été observé dans les cellules en régénération, peut-être suite à la digestion de la paroi, afin de protéger le protoplaste (Shibaya & Sugawara, 2009). Des hémicelluloses telles que les mannanes (BS 400-4) et, en plus faible quantité, les xyloglucanes (anticorps LM15) apparaissent, mais le xylane (anticorps LM10) n'est pas détecté. Les pectines de type homogalacturonane (HG déméthylés : LM198, faiblement méthylés : anticorps JIM5 et LM18 ; ou fortement méthylés JIM 7 et LM20) sont absentes. Elles commencent à être détectées seulement à partir des premières divisions et élongations cellulaires, quand les protoplastes sont en voie de se développer. Les anticorps reconnaissant les rhamnogalacturonanes de type I (RG-I), dirigés contre les 1,5-α-L-arabinane (anticorps LM6) et 1,4-β-D-galactane (anticorps LM5), ont été détectées dans certaines cellules plus épaisses ou en division.

Dans les protonémas, il a été observé que la cellulose s'accumule préférentiellement en condition de stress osmotique induit par le mannitol, ce qui confère aux cellules une morphologie courte et épaisse. Les parois déposées dans ces conditions sont aussi riches en callose, puis pauvre en xyloglucanes, tandis que les mannanes et les arabinanes marquent surtout les extrémités apicales et les parois formées après transfert d'un milieu sans mannitol vers un milieu osmotique. Inversement, les homogalacturonanes ne se déposent que dans les parois produites en absence de mannitol, indiquant une régulation de la production de la cellulose et des pectines face au stress osmotique (T. Wang et al., 2016). Ce qui signifie qu'en conditions normales de culture, les pectines homogalacturonanes sont davantage produites que la cellulose dans les parois des protonémas. De plus, l'utilisation de différents anticorps afin d'observer les HG dé-méthylés (LM19), faiblement méthyl-estérifiés (JIM5 et LM18) et les HG méthyl-estérifées (LM20 et JIM7), montrent que les toutes les formes de méthylation d'homogalacturonanes sont présentes dans les protonémas.

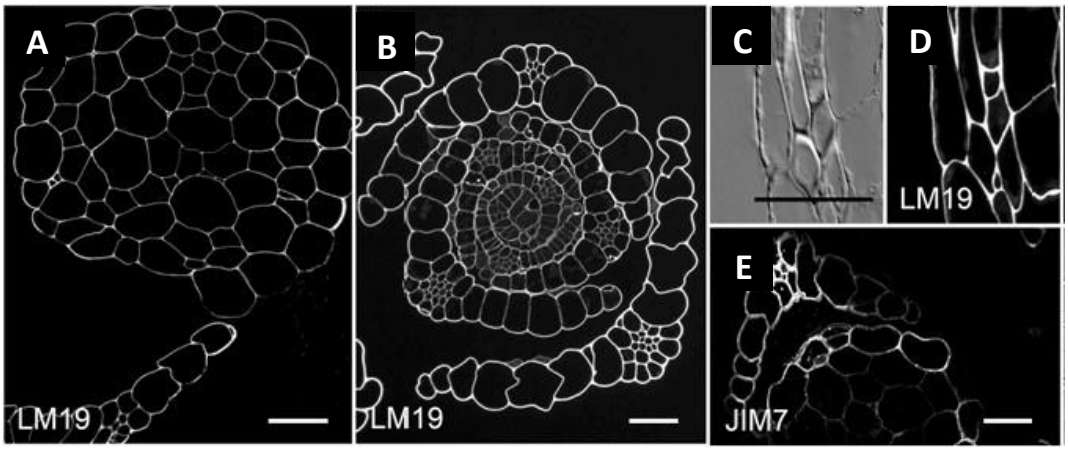


Figure 29 : Photos de coupes transversales de gamétophores de *Physcomitrium patens* immunomarqués par des anticorps.

Marquage des homogalacturonanes dé-estérifiés de gamétophores par LM19 (A, B, D) et d'homogalacturonanes méthylestérifiés par JIM7 (E). Vue en lumière blanche (C).
Echelle = 50 µm

(Berry et al., 2016)

Dans les gamétophores, la cellulose est ubiquitaire et particulièrement abondante dans les jeunes cellules en expansion. La callose, quant à elle, se localise au niveau des plaques de division et des parois récemment formées, tandis que les tissus matures montrent un marquage ponctuel. Les mannanes constituent l'hémicellulose dominante dans l'ensemble des tissus, ce qui est cohérent avec ce qui a déjà été analysé par tests chimiques (Moller et al., 2007). Les xylanes, toujours très faiblement détectés, sont confinés ici dans les gamétophores au niveau des cellules des poils axillaires (Kulkarni et al., 2012 ; Moller et al., 2007). Le xyloglucane, détecté en faible quantité dans les protonémas, est absent des gamétophores. Les homogalacturonanes sont présents dans toutes les parois et apparaissent en proportion plus élevée dans les feuilles en maturation **(figure 29)**. Les formes méthyl-estérifiées d'HG révèlent un marquage contrasté selon les sondes, suggérant des épitopes distincts, puisque seule la sonde JIM7 a montré un marquage, contrairement à la sonde LM20 qui n'en montre pas. Les galactanes se limitent surtout aux parois des hydroïdes, des cellules à fine paroi et gorgées d'eau, et des protoplastes, tandis que les arabinanes marquent surtout les tiges matures (Berry et al., 2016).

Les rhizoïdes, les filaments fixateurs se trouvant sous les gamétophores, montrent un enrichissement en arabinanes dans leurs parois et une plus faible présence de cellulose et d'homogalacturonanes. Leurs parois transversales contiennent de la callose, tandis que les mannanes apparaissent ponctuellement aux points de ramification. Les rhizoïdes pigmentés, étant à un stade de développement plus avancé et ayant accumulé des pigments bruns, principalement des métabolites secondaires comme des composés phénoliques oxydés, perdent en revanche toute réactivité aux sondes testées, témoignant d'une modification radicale de la paroi au cours de leur maturation (Berry et al., 2016).

Ainsi, la paroi cellulaire de *P. patens* se caractérise par une hétérogénéité marquée selon les organes et le stade de développement. La cellulose et les mannanes sont des composants universels, mais leur abondance et localisation varient. La callose joue un rôle dans les phases de division et est une réponse au stress osmotique, des implications visiblement bien conservées chez les mousses et les plantes vasculaires (Chen & Kim, 2009). Les homogalacturonanes sont présents surtout dans les tissus différenciés et en absence de contrainte osmotique, tandis que les arabinanes et galactanes se répartissent différemment selon les types cellulaires (Berry et al., 2016).

III.3.1. Biosynthèse et facteurs de régulation

La paroi cellulaire de *Physcomitrium patens* est dynamique et complexe. Elle est constituée de cellulose, d'hémicelluloses et de pectines. Mais également de callose, de protéines et de glycoprotéines, en plus de présenter des particularités propres aux mousses. Chez *P. patens*, différentes Cellulose synthase A (CesA) interviennent spécifiquement dans la formation des parois primaires : par exemple, PpCesA3 et PpCesA8, des celluloses synthases de classe A ; et PpCesA6 et PpCesA7, des celluloses synthases de classe B, qui participent aux parois secondaires des cellules stérides, la couche multicellulaire centrale des phyllides des gamétophores (Norris et al., 2017). Tandis que PpCesA5 contribue à la production de cellulose dans les parois primaires, notamment dans les bourgeons gamétophores. D'autres enzymes comme les CELLULOSE SYNTHASE-LIKE (CSL) peuvent produire des polysaccharides similaires à la cellulose, tels que les glucanes mixtes, (1,3 ;1,4)-β-glucanes, qui contribuent à la résistance mécanique de la paroi (Little et al., 2018).

Concernant les hémicelluloses de la paroi de *P. patens*. L'enzyme AGlcS, une arabinoglucane synthase, différente des CesA/CsI (Cellulose Synthase Interactive Protein) habituelles, produit un arabinoglucane, formé d'une chaîne de glucose liés en β-1,4 dans laquelle s'insèrent des résidus d'arabinose β-1,3 (Little et al., 2018 ; Roberts et al., 2018). Ce type de polymère rare a également été trouvé chez la plante lycophyte *Selaginella moellendorffii*, mais a été perdu chez les plantes à graines. Ceci suggère que *P. patens* conserve une capacité ancestrale de biosynthèse (Harholt et al., 2012 ; Roberts et al., 2018). Chez *P. patens*, on trouve un motif de xyloglucane particulier dit XXGGG, proche de celui des graminées, mais dépourvu d'acétylation, présente chez les plantes vasculaires (Peña et al., 2008). Plusieurs motifs uniques, combinant galactose, arabinose et acide galacturonique, enrichissent sa structure. La chaîne principale est synthétisée par des enzymes de la famille Cellulose Synthase-Like C (CslC), tandis que les résidus xyloses sont ajoutés par les XXTs (GT34) (Cavalier & Keegstra, 2006).

Des gènes de la famille GT47 (comme *PpXLT2* et *PpXDT*) participent aux substitutions en ajoutant du galactose ou de l'arabinose (Jensen et al., 2012 ; Zhu et al., 2017). Ensuite, les xylanes, qui se composent d'une chaîne de xylose lié en β-1,4, sont substitués par des résidus de glucuronate et partiellement acétylés en O-2 et O-3 (Zhong et al., 2019). La biosynthèse de la chaîne principale implique un complexe d'enzymes homologues aux IRX10 (IRegular Xylem, GT47) et IRX9/14 (GT43) d'*Arabidopsis*. L'ajout de glucuronates semble assuré par des homologues des GUX (GT8), bien que leur rôle précis n'ait pas encore été confirmé (Mortimer et al., 2010). L'absence de méthylation, contrairement aux xylanes de plantes vasculaires qui sont partiellement méthylés, est liée au fait que la protéine DUF579 de la mousse est inactive, contrairement aux trachéophytes. Enfin, l'origine de l'acétylation n'a pas encore été élucidée, car aucun homologue d'acétyltransférase n'a été identifié dans *P. patens* (Haghighat et al., 2016).

Les glucomannanes sont eux aussi bien représentés chez *P. patens*. Ils sont constitués de résidus de mannose et de glucose (ratio 4:1) liés en β-1,4, avec une acétylation partielle en O-2 et O-3 du mannose (Zhong et al., 2019). Leur synthèse repose sur des enzymes CslA (GT2), notamment PpCslA1 et PpCslA2, capables d'incorporer à la fois du GDP-mannose et du GDP-glucose pour allonger la chaîne (Liepman et al., 2007). L'acétylation est assurée par des mannan O-acétyltransférases (MOATs) de la famille DUF231, plusieurs homologues actifs ayant été identifiés dans la mousse. En revanche, *P. patens* ne possède pas d'enzymes permettant d'ajouter des résidus de galactose (α-1,6-galactosyltransférases), ce qui explique pourquoi ses glucomannanes ne sont pas galactosylés, contrairement à ceux de certaines plantes à graines (Zhong et al., 2019).

Enfin, concernant les pectines, leur biosynthèse est un processus particulièrement complexe (voir **I.4.4.**), nécessitant chez les plantes à graines l'intervention d'au moins soixante-sept enzymes distinctes, incluant des glycosyltransférases, des méthyltransférases et des acétyltransférases. Bien qu'aucune de ces enzymes n'ait encore été caractérisée fonctionnellement chez *P. patens*, des analyses bioinformatiques ont révélé la présence de nombreux orthologues putatifs impliqués dans cette voie, tels que des galacturonosyltransférases, des β-1,4-galactosyltransférases responsables de l'allongement des galactanes, des xylosyltransférases du RG-II, ainsi que des méthyltransférases du HG et des acétyltransférases. En revanche, aucun homologue d'arabinosyltransférases du RG-I ni de xylosyltransférases de xylogalacturonanes n'a été identifié dans le génome de la mousse (McCarthy et al., 2014).

III.3.2. Rôle de la paroi dans le développement cellulaire de *P. patens*

Chez *Physcomitrium patens*, la composition de la paroi cellulaire est intimement liée au développement et à la différenciation cellulaire. La cellulose, présente dans toutes les parois, confère la rigidité nécessaire à la croissance, mais son abondance varie selon les conditions. Elle s'accumule davantage en réponse à un stress osmotique, ce qui limite l'allongement cellulaire et conduit à des cellules plus courtes et épaisses (Berry et al., 2016 ; Wang et al., 2016). Cette modulation montre que la plante ajuste sa paroi pour contrôler la forme et la résistance des cellules en fonction de l'environnement. La callose est surtout présente au niveau des méristèmes et dans les zones de divisions cellulaires, mais également dans les parois nouvellement déposées, jouant un rôle de stabilisation pendant la cytokinèse et dans certaines zones soumises à des contraintes mécaniques ou de développement (Chen & Kim, 2009 ; Schuette et al., 2009 ; Shibaya & Sugawara, 2009).

Les hémicelluloses, en particulier les mannanes, constituent une charpente qui s'associe à la cellulose pour renforcer les parois, notamment dans les tissus spécialisés comme les stéréides des phyllides. Leur répartition dans les jonctions cellulaires et les zones de croissance suggère un rôle dans la cohésion et la communication intercellulaire (Lee et al., 2011 ; Liepman et al., 2007). À l'inverse, les xylanes et xyloglucanes ne sont présents que dans des types cellulaires ou des conditions particulières, ce qui indique une contribution plus spécialisée à la structure pariétale (Carafa et al., 2005 ; Marcus et al., 2008).

Enfin, les pectines, notamment les homogalacturonanes et les rhamnogalacturonanes, participent à la plasticité de la paroi. Leur abondance est élevée dans les tissus en maturation, ce qui reflète un rôle de régulation de l'élasticité et de la cohésion intercellulaire lors de la différenciation des organes comme les gamétophores et les feuilles (Kulkarni et al., 2012 ; McCarthy et al., 2014). Ainsi, le développement cellulaire de *P. patens* repose sur une dynamique pariétale fine. La cellulose et la callose assurent la rigidité et la protection immédiate. Tandis que les hémicelluloses et les pectines modulent la plasticité pariétale notamment en cas de différenciation cellulaire. La variabilité spatiale et temporelle de ces composants, contrôlée par l'activité d'enzymes spécifiques, montre que la paroi joue un véritable rôle dans la régulation du développement et de l'adaptation cellulaire.

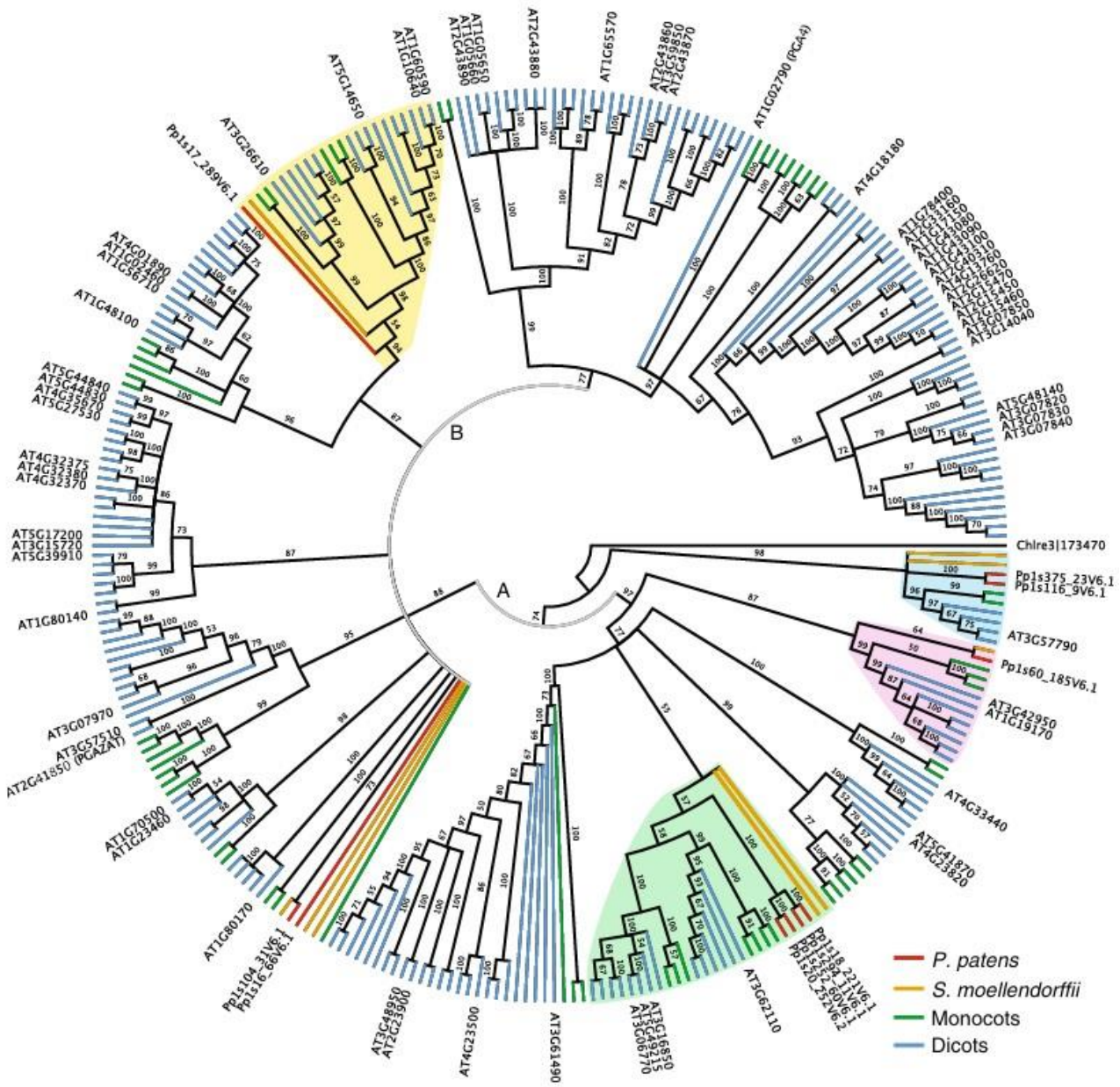


Figure 30 : Arbre phylogénétique de la famille des polygalacturonases.

Quatre clades monophylétiques contenant les gènes de polygalacturonases provenant de monocotylédones (Vert), de dicotylédones (Bleu) et de lycophytes Selaginella (Jaune) et bryophytes Physcomitrium (Rouge). L'arbre présente deux grandes branches, ou polytomies, nommées A et B. La polytomie B regroupe les membres non résolus de Physcomitrium et de Selaginella.

(McCarthy et al. 2014)

III.3.3. Les enzymes de remodelage des pectines chez *P. patens*

Concernant les enzymes de remodelage des pectines chez *Physcomitrium patens*, les polygalacturonases (PGs) et les pectine méthylestérases (PMEs) constituent des éléments clés du remodelage des pectines de la paroi, notamment au niveau de la croissance apicale des protonémas (McCarthy et al., 2014). Chez *P. patens*, la famille des PGs est relativement réduite, avec une dizaine de membres identifiés dans les analyses génomiques, contre plus de 68 chez *Arabidopsis thaliana*. L'analyse phylogénétique révèle que certaines PGs sont profondément conservées à travers les lignées végétales : les PGs de *Physcomitrium* ont des orthologues chez *Arabidopsis*, suggérant que ces enzymes étaient déjà fonctionnelles chez l'ancêtre commun des plantes terrestres **(Figure 30)**. Cette conservation indique leur rôle central dans les mécanismes fondamentaux de croissance cellulaire par modification de la paroi pectique.

Le profil d'expression des *PGs* de *Physcomitrium*, et les analyses de localisation des pectines, semblent montrer une prédisposition de ces PGs à agir principalement dans les tissus à croissance apicale, notamment les protonémas et les gamétophores (Berry et al., 2016 ; McCarthy et al., 2014). Cela contraste avec les trachéophytes, où la diversification des PGs est beaucoup plus importante où elles jouent un rôle dans des processus variés tels que l'abscission des organes, la maturation des fruits, ou encore l'élongation cellulaire spécifique de certaines structures (Yang et al., 2018). Ainsi, les plantes vasculaires bénéficient d'une flexibilité fonctionnelle étendue grâce à leur famille élargie d'enzymes. Là où chez les bryophytes, dont *Physcomitrium*, les fonctionnalités des PGs seraient plus restreintes (McCarthy et al., 2014).

Les pectine méthylestérases (PMEs) de *Physcomitrium* sont également moins nombreuses (46 gènes) que chez *Arabidopsis* (66 gènes) (Sénéchal et al., 2014). Les gènes *PME* de *Physcomitrium* présentent un niveau d'expression élevé dans les tissus apicaux en croissance, soulignant un rôle probablement important des enzymes codées dans le contrôle localisé de l'élasticité de la paroi. Chez *Arabidopsis*, la présence de plus de 70 PMEIs, permet une régulation fine et spécifique des tissus. Au contraire, il n'a pu être identifié qu'un seul gène codant pour un PMEI chez *Physcomitrium patens* (McCarthy et al., 2014).

En résumé, bien que *Physcomitrium* présente des familles réduites de PGs et PMEs, ce panel d'enzymes est suffisant pour réguler le remodelage des chaînes HG afin de permettre le développement tri-dimensionnel de l'organisme. Les données phylogénétiques et d'expression indiquent que les mécanismes enzymatiques fondamentaux étaient déjà établis chez les premières plantes terrestres, tandis que la diversification observée chez *Arabidopsis* illustre une adaptation à des besoins morphologiques et physiologiques plus complexes (Markovič & Janeček, 2004 ; McCarthy et al., 2014).

OBJECTIFS DE LA THESE

La paroi cellulaire végétale est une structure dynamique dont le remodelage conditionne directement la croissance, la morphogénèse et la différenciation cellulaire. Parmi ses constituants majeurs, les pectines, en particulier les homogalacturonanes (HG), jouent un rôle clé dans la modulation des propriétés mécaniques de la paroi. Les polygalacturonases (PG), qui interviennent après l'action des pectine méthylestérases (PME), contrôlent le degré de polymérisation des HGs, modulant ainsi la rigidité pariétale et la capacité des cellules végétales à s'allonger et à se diviser.

Si le rôle des PGs a été largement étudié chez les plantes vasculaires, leurs fonctions chez les bryophytes restent encore peu documentées. Or, l'étude de ces organismes représente un enjeu pour comprendre les mécanismes et l'évolution du contrôle de la croissance chez les plantes terrestres. De ce fait, *Physcomitrium patens* constitue un modèle particulièrement pertinent, en raison de son cycle de développement à dominance haploïde, de son organisation simple, de la conservation des composants pariétaux et des gènes codants pour des PGs, ainsi que des outils génétiques et cellulaires performants applicables à son étude. Ce modèle offre ainsi un cadre expérimental privilégié pour analyser le rôle du remodelage pectique dans la morphogénèse.

Dans ce contexte, comprendre comment les polygalacturonases contribuent au remodelage pectique et au contrôle de la croissance chez *Physcomitrium patens* représente le principal enjeu de cette thèse. Il s'agit également d'identifier les mécanismes moléculaires, biochimiques et fonctionnels qui régulent l'activité de ces enzymes afin de mieux comprendre comment elles agissent sur la plasticité pariétale et donc sur le développement végétal.

Les objectifs de cette thèse sont ainsi divisés en plusieurs parties :

1. **Evaluer l'impact d'une inhibition des enzymes de remodelage des pectines.**

Le Polyphenon 60 (PP60) sera utilisé comme inhibiteur des PGs et PMEs. Les effets de l'application exogène de PP60 seront analysés sur la croissance cellulaire de *Physcomitrium patens*, notamment des protonémas, pour étudier l'élongation et la division cellulaire des chloronémas et caulonémas, ainsi que sur le développement des gamétophores. Cette approche permettra de tester l'hypothèse selon laquelle la modification des HGs, provoquée par l'inhibition des PGs et des PMEs, affecte le développement de la plante.

2. **Caractériser biochimiquement et structurellement les PGs de *Physcomitrium patens*.**

Des PGs de *P. patens* seront sélectionnées sur la base de données bio-informatiques. Les structures tridimensionnelles de ces PGs seront prédites et analysées afin d'identifier la présence et la localisation de sites actifs, ainsi que de confirmer l'appartenance de ces protéines à la famille GH28 et de mieux comprendre le lien entre particularité structurales et mode d'action. Après production en système hétérologue et purification, leurs paramètres biochimiques, tels que la spécificité de substrat ainsi que les conditions optimales de pH et de température, seront déterminées. Leurs produits de digestion sur des substrats définis seront analysés pour caractériser leur mode d'action et le mettre en corrélation avec les phénotypes obtenus chez les mutants produits.

3. **Déterminer la contribution fonctionnelle de PGs spécifiques au développement végétal.**

Des mutants *P. patens* de délétion simples et multiples par approche CRISPR-Cas9 ainsi que des lignées de surexpression inductible pour des PG spécifiques seront générés et caractérisés. Les phénotypes de croissance, d'élongation cellulaire et de branchement des protonémas, ainsi que de développement des gamétophores, seront comparés entre les différents mutants et la plante sauvage. La composition pariétale, ainsi que l'activité polygalacturonase totale seront également déterminés afin d'établir des corrélations entre la perte ou la surexpression d'un gène *PG* et la modulation fine de la composition pariétale, d'éventuelles compensations, ou des défauts développementaux. Ceci doit permettre de relier pour les différentes isoformes de PG, leurs modes d'action à leur fonction dans le développement.

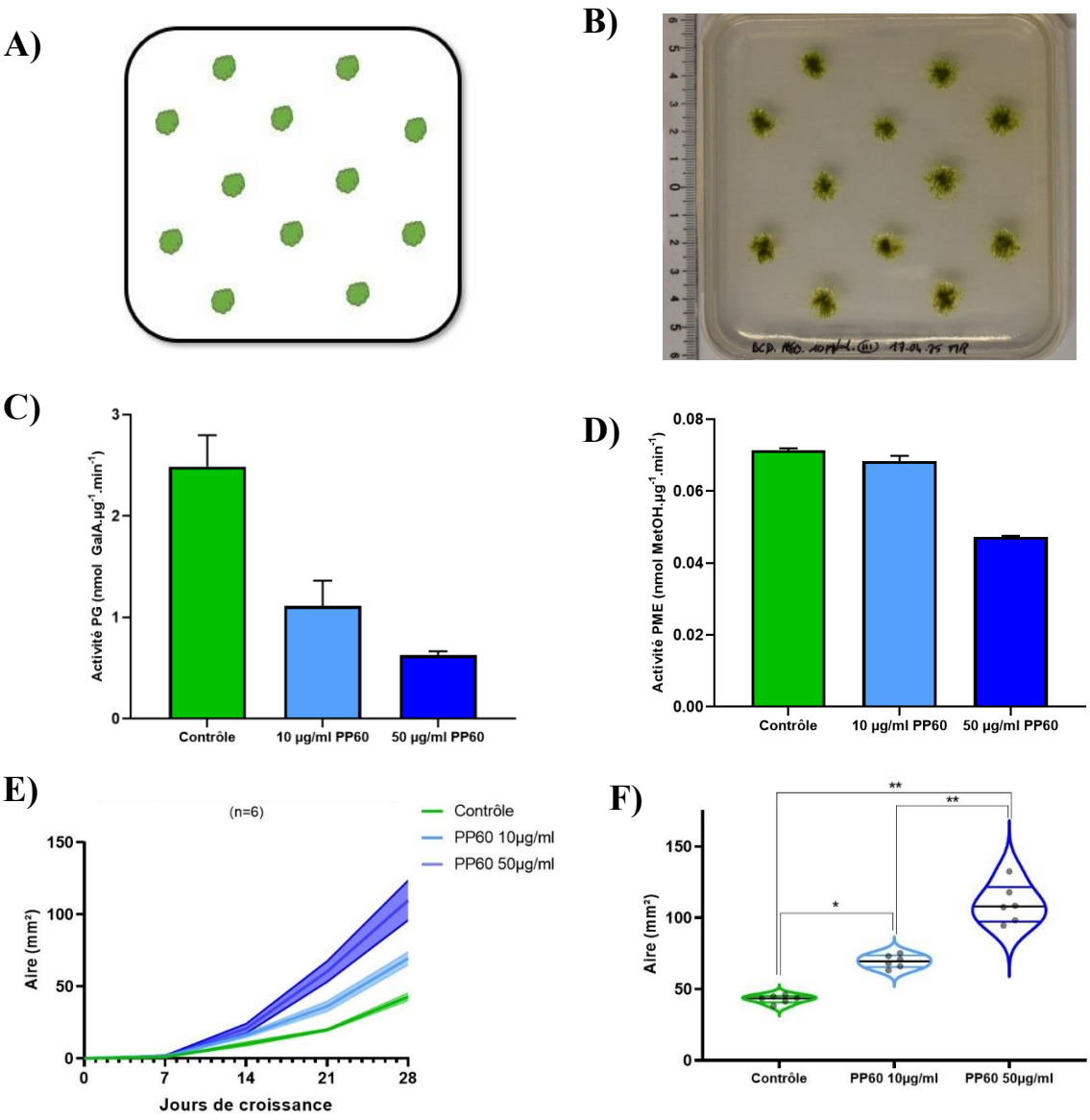


Figure 31 : Phénotypage de la croissance bidimensionnelle de *Physcomitrium patens* sur milieu BCD avec PP60.

A) Représentation schématique du dispositif de phénotypage de 12 transplants sauvages de taille approximativement identiques déposés à J0, isolés les uns des autres. **B)** Chaque isolat d'une boite est mesuré pour former une moyenne d'aire par boite. Ici l'exemple d'une photographie à J+28 de la boite numéro 3 de la condition PP60 10µg/mL. **C)** Activité PG après 28 jours de culture à J28 pour chacune des conditions de culture. **D)** Activité PME après 28 jours de culture à J28 pour chacune des conditions de culture. **E)** Développement des transplants sur 28 jours. Les 6 boites par conditions (n=6) sont photographiées et chaque isolat est mesuré pour former une moyenne d'aire par boite à J0, J7, J14, J21 et J28. **F)** Représentation en violon des moyennes d'aires des 6 boites par conditions à J+28. Un test One-way ANOVA a été effectué, la condition PP60 10µg/mL par rapport à la condition Contrôle a une p value = 0.0002. Et PP60 50µg/mL par rapport à PP60 10µg/mL et Contrôle a une p value < 0.0001.

RESULTATS

CHAPITRE I : IMPACT DE LA STRUCTURE DES HG SUR LE DEVELOPPEMENT DE *Physcomitrium patens*

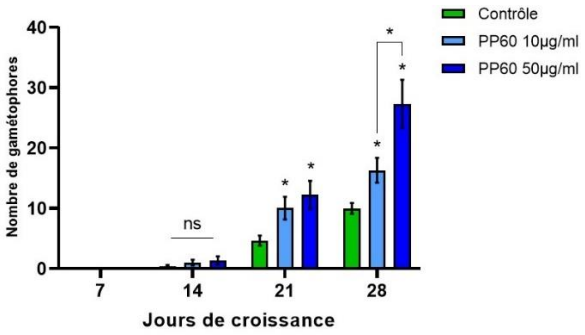
I.1. Phénotypage de *P. patens* sauvage et application exogène de PP60

I.1.1. Phénotypage de la croissance bidimensionnelle de *P. patens* avec ou sans PP60

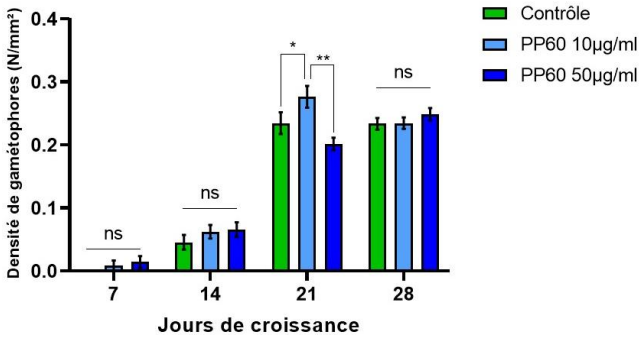
Dans le but d'étudier l'impact de la structure des HGs et donc le rôle des enzymes de remodelage de ce domaine pectique dans le développement végétatif de *Physcomitrium patens*. Nous avons commencé par inhiber l'activité de ces enzymes pour ensuite comparer le développement de la plante avec un témoin négatif. Le polyphenon 60 (PP60) a été démontré comme ayant un effet inhibiteur sur l'activité des pectine methylestérases (PMEs) et des polygalacturonases (PGs) (Hocq et al., 2020 ; L'Enfant et al., 2015). L'usage de PP60 sur du tissu végétal devrait donc inhiber l'activité des PMEs et PGs au sein de la paroi cellulaire. Nous avons donc supplémenté le milieu de culture solide BCD avec du PP60 à 10µg/mL et 50µg/mL afin d'observer les effets du PP60, *via* la modification de la structure des HGs, sur la croissance de *Physcomitrium patens* selon le dispositif expérimental présenté **figure 31 A**. Puis, après une mise en culture à 24°C, nous avons photographié chaque boite, soit 6 par conditions, afin d'effectuer les mesures des aires des tissus à J7, J14, J21 puis J28 **(figure 31 B)**. L'impact du PP60 sur les activités enzymatiques PME et PG a été quantifié à la fin de la cinétique, sur des extraits enrichis en protéines pariétales. Comme le montrent les résultats **figure 31 C** et **D**, l'effet du PP60 est dose-dépendant et conduit à une diminution de ces activités enzymatiques, particulièrement forte dans le cas de l'activité PG.

L'application de PP60 entraîne une augmentation de l'aire des clones, traduisant une augmentation de la croissance bidimensionnelle de *Physcomitrium patens*. Cet effet provoqué par PP60 est dose-dépendant. Le tissu des témoins sans supplément de PP60, atteint une aire moyenne d'environ 25 mm² au 21ème jour de croissance, et de 50 mm² au 28ème jour. Sur les transplants de *P. patens* sur du milieu BCD supplémenté en PP60 à 10µg/mL,

A)



B)



C)

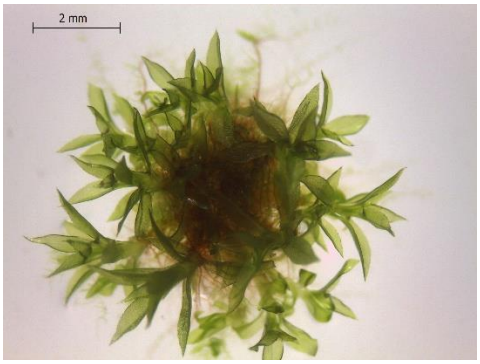


Figure 32 : Phénotypage de la croissance tridimensionnelle de *Physcomitrium patens* sur milieu BCD avec PP60.

A) Mesures du nombre moyen de gamétophores des isolats sur chaque boite par conditions aux jours 7, 14, 21 et 28 de croissance. Un test Two-way ANOVA montre des différences significatives entre la condition Contrôle et PP60 10µg/mL, et PP60 50µg/mL à 21 et 28 jours de croissance. Puis entre PP60 10µg/mL et PP60 50µg/mL à 28 jours. (*p value < 0,0001). **B)** Densité de gamétophores. Un test Two-way ANOVA montre des différences significatives entre la condition PP60 10µg/mL et la condition Contrôle (*p value 0,0276), et la condition PP60 50µg/mL (**p value < 0,0001) à 21 jours de croissance. **C)** Photo d'un isolat et de ses gamétophores au 21ème jour, à la condition PP60 10µg/mL.

on observe que l'aire de chaque isolat atteint une moyenne d'environ 40 mm² au 21ème jour, puis atteint un peu plus de 60 mm² de moyenne au 28ème jour, comme présenté dans la **figure 31**. Enfin, dans la condition où le milieu est supplémenté en PP60 à 50µg/mL, on observe une nette augmentation de l'aire moyenne, qui atteint 60 mm² au 21ème jour, puis plus de 100 mm² au 28ème jour.

I.1.2. Phénotypage de la croissance tridimensionnelle de *P. patens* avec ou sans PP60

Si la croissance bidimensionnelle traduit le développement des tissus protonémaux de la mousse, la croissance tridimensionnelle, qui se déclenche lors de la production de bourgeons sur les caulonémas, traduit quant à elle le développement des gamétophores. Le développement des gamétophores peut être mesuré en les dénombrant pour déterminer le niveau d'avancement de la mousse dans la phase de maturité.

Nous avons ainsi observé que la présence de PP60 dans le milieu de culture provoquait une augmentation de la quantité de gamétophores par isolat. Le nombre de gamétophores moyen passe d'environ 10,05 et 12,236 par isolats aux conditions PP60 10 et 50µg/mL respectivement au 21ème jour, puis à 16,32 et 27,32 gamétophores par isolats respectivement au 28ème jour de croissance **(figure 32 A)**. Pour comparaison, le nombre de gamétophores en absence de PP60 est en moyenne de 5 au 21ème jour et de 10 au 28ème jour. Le nombre de gamétophores est donc significativement plus important dans les conditions PP60 10 et 50µg/mL par rapport au contrôle à partir du 21ème jour avec une p value <0.0001. Et entre les deux conditions PP60 10 et 50µg/mL au 28ème jour avec une p value <0.0001 suivant un test statistique Two-way Anova. L'effet du PP60 sur l'apparition des gamétophores est donc dose-dépendant.

Cependant, ces résultats sont à corréler avec la différence de l'aire moyenne des isolats *P. patens* en fonction de la concentration de PP60. En effet, si on rapporte le nombre de gamétophores à la surface de l'aire en mm² de chaque isolat, soit la densité de gamétophores, on n'observe plus de différences significatives au 28ème jour de croissance, pour n'importe quelle condition, avec ou sans PP60 **(figure 32 B)**. La seule différence significative est celle de la condition PP60 10µg/mL qui tend à développer plus de gamétophores que la condition contrôle et que la condition PP60 50µg/mL. Cette différence n'est plus significative au 28ème jour de croissance.

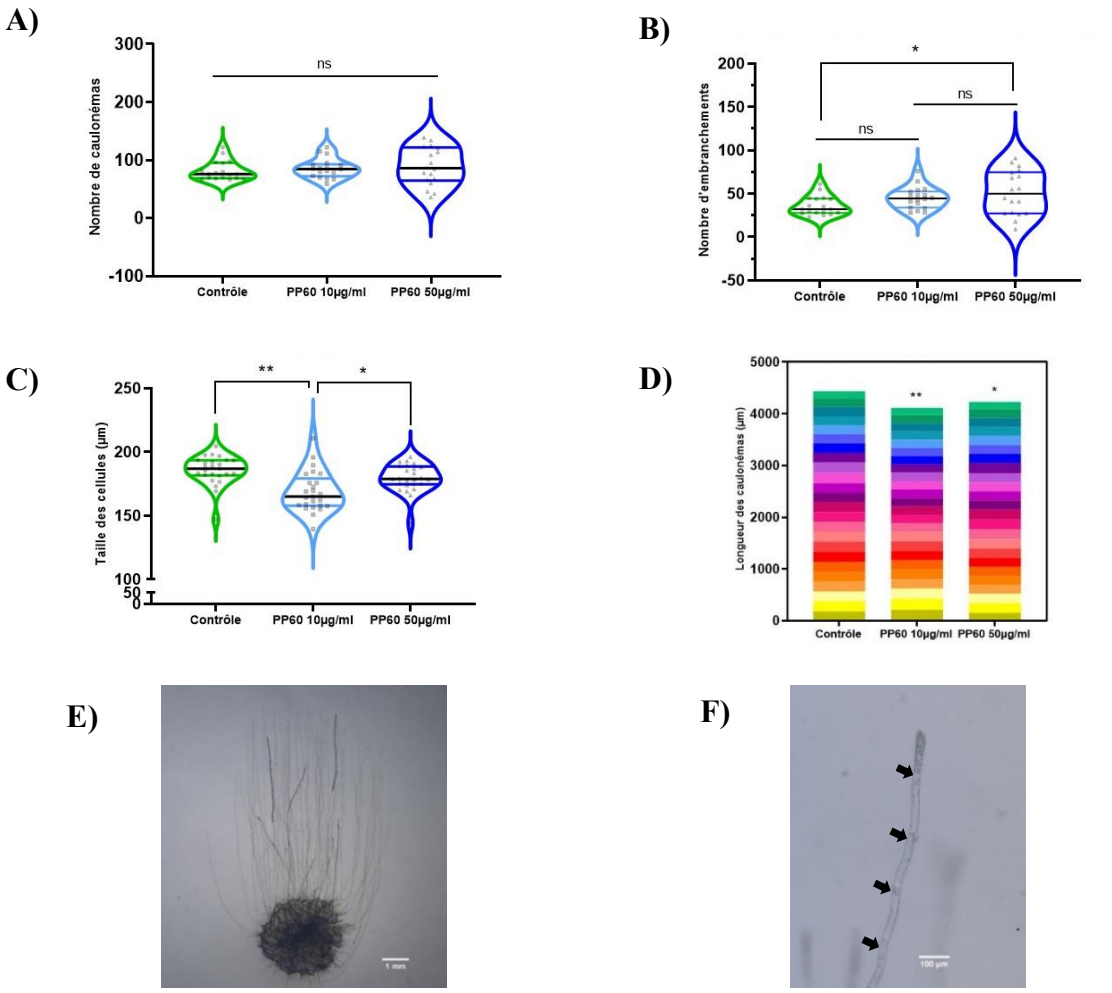


Figure 33 : Phénotypage de la croissance des caulonémas agravitropiques de *Physcomitrium patens* sur milieu BCD en présence de PP60.

A) Nombre moyen de caulonémas agravitropiques par boite de culture sur BCD contrôle ou supplémenté en PP60 à 10 et à 50µg/mL. **B)** Nombre moyen d'embranchements de caulonémas pour les conditions contrôle, ou supplémentée en PP60 à 10 et 50µg/mL. Un test One-way ANOVA montre une différence significative entre le Contrôle et PP60 50µg/mL (*p value = 0,0315). **C)** Taille moyenne des 25 premières cellules de caulonémas agravitropiques (n=4) dans les conditions contrôle, ou supplémentée en PP60 à 10 et 50µg/mL. Un test One-way ANOVA montre des différences significatives entre PP60 10µg/mL et PP60 50µg/mL (*p value = 0,0119), et Contrôle (**p value < 0,0001). **D)** Longueurs cumulées des 25 premières cellules de caulonémas (n=4) dans les conditions contrôle, ou supplémentée en PP60 à 10 et 50µg/mL. Chaque couleur représente 1 cellule avec vert, cellule 1 et jaune, cellule 25. Un test Two-way ANOVA montre des différences significatives entre le Contrôle et PP60 10µg/mL (*p value = 0,0378), et PP60 50µg/mL (**P value = 0,0009). **E)** Photographie prise au macroscope d'un isolat de *P. patens* comportant des caulonémas agravitropiques après 14 jours de croissance à l'obscurité, sur milieu BCD contrôle. **F)** Photo prise au macroscope d'une extrémité de caulonéma agravitropique. Les cloisons obliques, présentées par les flèches noires, délimitant les cellules sont bien visibles.

I.1.3. Phénotypage des caulonémas agravitropiques de *P. patens* avec ou sans PP60

Afin de comprendre si l'augmentation de croissance des protonema induite par le PP60 est due au développement des chloronémas ou des caulonémas, les plantes ont été mises en culture à l'obscurité. En effet, ces conditions promeuvent l'allongement et la formation des caulonémas et inhibent la croissance des chloronémas, permettant ainsi de mieux caractériser la morphologie et la division des cellules de caulonémas (Hoffmann et al., 2014).

Le nombre de caulonémas agravitropiques a été compté sur les différents isolats, en culture sur du milieu BCD supplémenté en PP60 à 10 ou 50µg/mL en regard du milieu BCD contrôle. Le nombre de caulonémas agravitropiques moyen, à 14 jours, est de de 81,44 par isolats pour la condition contrôle, 85,72 pour la condition PP60 10µg/mL et 89,11 pour la condition PP60 50µg/mL **(figure 33 A)**. Ces différences sont non significatives après test statistique en One-way ANOVA. Nous avons également compté le nombre d'embranchements de caulonémas, donc les divisions cellulaires adjacentes au sein des caulonémas agravitropiques **(figure 33 B)**. Il a été mis en évidence une moyenne de 35,89 embranchements par isolats en condition contrôle, 44,94 en condition PP60 10µg/mL et 51,17 en conditions PP60 50µg/mL, soit une différence significative avec une p value de 0,0315 pour cette dernière condition par rapport au contrôle.

Dans un second temps, nous avons observé les caulonémas agravitropiques à l'échelle cellulaire. A partir des extrémités apicales de caulonémas, les différentes cellules ont été photographiées jusqu'à la base du tissu protonémal. Puis après avoir effectué une mosaïque de photographies et une mise à l'échelle, l'ensemble des cellules des différents caulonémas ont été mesurées pour les différentes conditions. Les cellules ont été numérotées de 1 à 25, depuis l'apex jusqu'à la base du caulonéma, respectivement. L'expérience a été réalisée en utilisant quatre caulonémas (n=4) par condition, issus d'isolats différents et de boîtes différentes. Une différence significative entre la moyenne de tailles des 25 premières cellules de caulonémas dans les différentes conditions a été mise en évidence **(figure 33 C)**. En moyenne, elle est de 184,52 µm en condition contrôle, contre 170,68 µm et 176,96 µm pour les conditions PP60 10 et 50 µg/mL, respectivement. La différence de tailles de la condition PP60 10 µg/mL est significative comparée au contrôle avec une P value <0.0001, tandis que la différence entre les deux conditions PP60, 10 et 50µg/mL, est significative avec un P value = 0.0119.

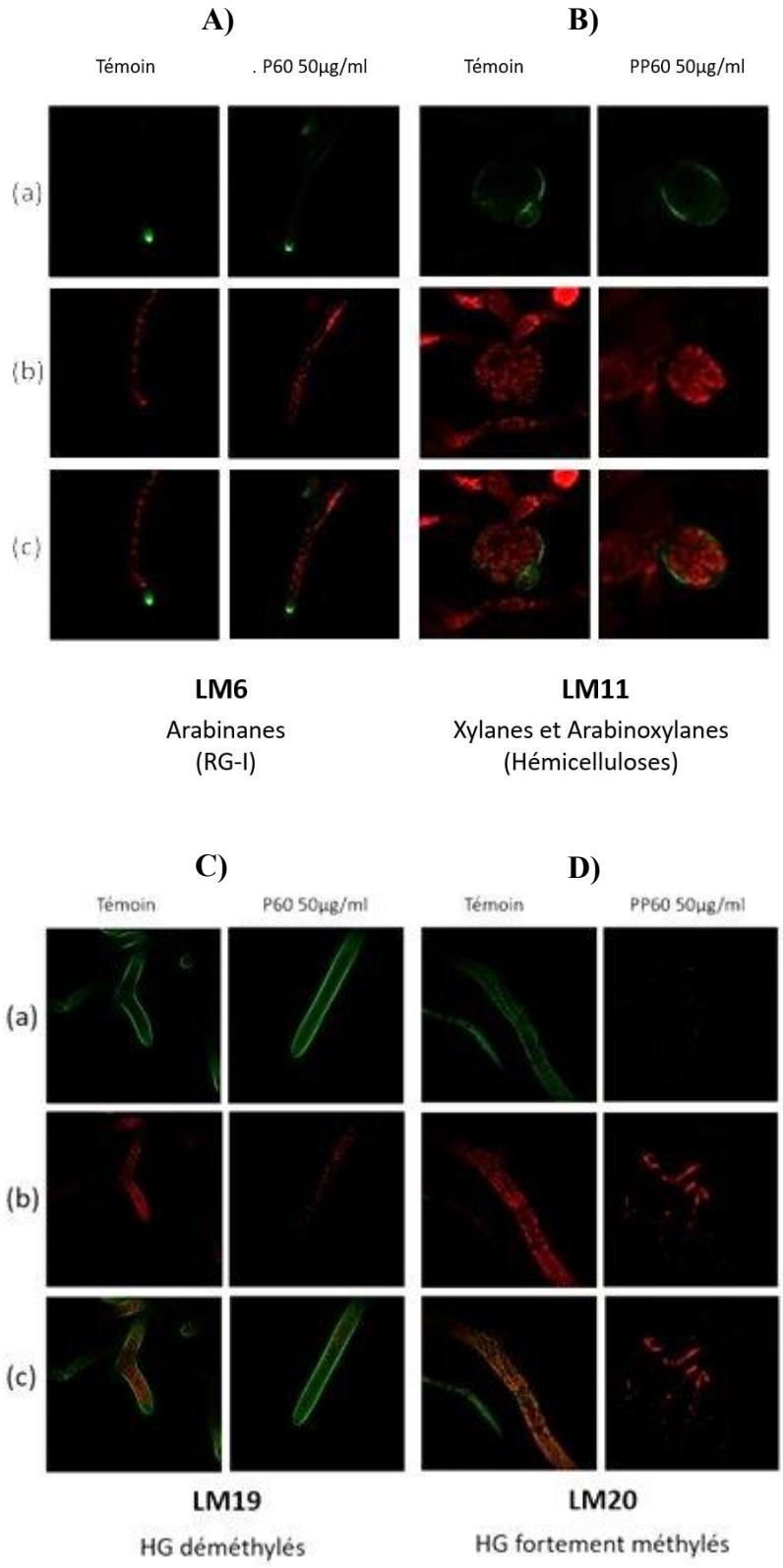


Figure 34 : Immunomarquage d'épitopes de composants pariétaux de *Physcomitrium patens* observé en microscopie confocale.

Anticorps : **(A)** LM6 : Anti-1,5-α-L-Arabinane. **(B)** LM11 : Anti-hétéroxylane. **(C)** LM19 : Anti-homogalacturonane démethylesterifié. **(D)** LM20 : Anti-homogalacturonane methylesterifié. Pour chaque anticorps, la condition PP60 à 50µg/mL correspond à la colonne de droite, et la condition contrôle de gauche, (a) anticorps révélés par Alexa fluor, (b) fluorescence des chloroplastes, (c) Fusion des deux images.

De plus, la moyenne des tailles de chaque cellule a été calculée et représentée en fonction de sa position au sein du filament, de la cellule 1 (apicale, verte) à la cellule 25 (jaune) **(figure 33 D)**. Ainsi, la taille moyenne des 25 premières cellules de caulonémas est de 4,61 en condition contrôle et de 4,26 et 4,42 pour les conditions PP60 10 et 50µg/mL, respectivement. Les analyses statistiques ont montré une différence significative de taille entre le contrôle et la condition PP60 avec une P value de 0,0009, et 0,0378 pour les conditions PP60 10 et 50 µg/mL respectivement.

I.2. Étude de la composition de la paroi de *P. patens* par immunomarquage

Afin d'identifier et de localiser différents composants pariétaux dans les tissus de *Physcomitrium patens* utilisés pour l'étude, un immunomarquage a été réalisé sur du tissu sauvage WT âgé de 7 jours, basé sur une méthode reconnue dans l'observation de tissus végétaux par immunofluorescence (Shimamura, 2015). Des protonémas en développement issus du même organisme ont été séparés dans plusieurs puits d'une plaque 24 puits, pour croître dans du milieu BCD liquide, supplémenté en PP60 à 50µg/mL, ou non, afin d'observer de potentielles variations de composition pariétale en présence de cet inhibiteur. Celles-ci sont révélées grâce à l'utilisation de quatre anticorps primaires: LM11 (Anti-hétéroxylane), permettant de localiser des épitopes de Xylane et d'Arabinoxylane, appartenant à la famille des hémicellulose ; puis pour les pectines, LM6 (Anti-1,5-α-L-Arabinane), permettant d'observer la localisation des épitopes des substitutions Arabinanes des domaines pectiques rhamnogalacturonanes de type I (RG-I) ; LM19 (Anti-homogalacturonane démethylesterifié), spécifique des épitopes de domaines pectiques homogalacturonanes (HG) dé-estérifiés et LM20 (Anti-homogalacturonane methylesterifié), spécifique des épitopes de domaines pectiques HG méthylestérifiées. Ces deux derniers anticorps permettent ensemble de distinguer les HG selon leur degré de méthylation (DM). Le LM6 et le LM19 ont déjà été utilisés et détectés comme épitopes positifs sur des protonemas de *P. patens* dans d'autres études, mais pas LM11 et LM20, ce dernier ayant été utilisé sur des protoplastes et des gamétophores mais n'ayant pas montré d'épitope positifs (Berry et al., 2016). Ces anticorps primaires sont ensuite hybridés à l'anticorps secondaire couplé à Alexa fluor 488, dont la fluorescence est distinguée de l'autofluorescence produite par les chloroplastes.

Les résultats de ces observations, présentés dans la **figure 34**, montrent d'abord une forte proportion de RG-I localisés aux apex des protonemas **(figure 34 A)**, laissant supposer un rôle des rhamnogalacturonanes-I dans la division cellulaire. Les hémicelluloses hétéroxylanes, semblent quant à eux se trouver en plus grande proportion au niveau des bourgeons en développement **(figure 34 B)**. Enfin, les homogalacturonanes dé-estérifiées sont présent en large proportion, aussi bien en absence qu'en présence de PP60, dans les parois de protonémas **(figure 34 C)**. Tandis que les homogalacturonanes méthylestérifiées semblent faiblement présents dans le cas du témoin, mais n'ont pas été localisés dans le cas des protonemas dans le milieu supplémenté en PP60 à 50µg/mL **(figure 34 D)**.

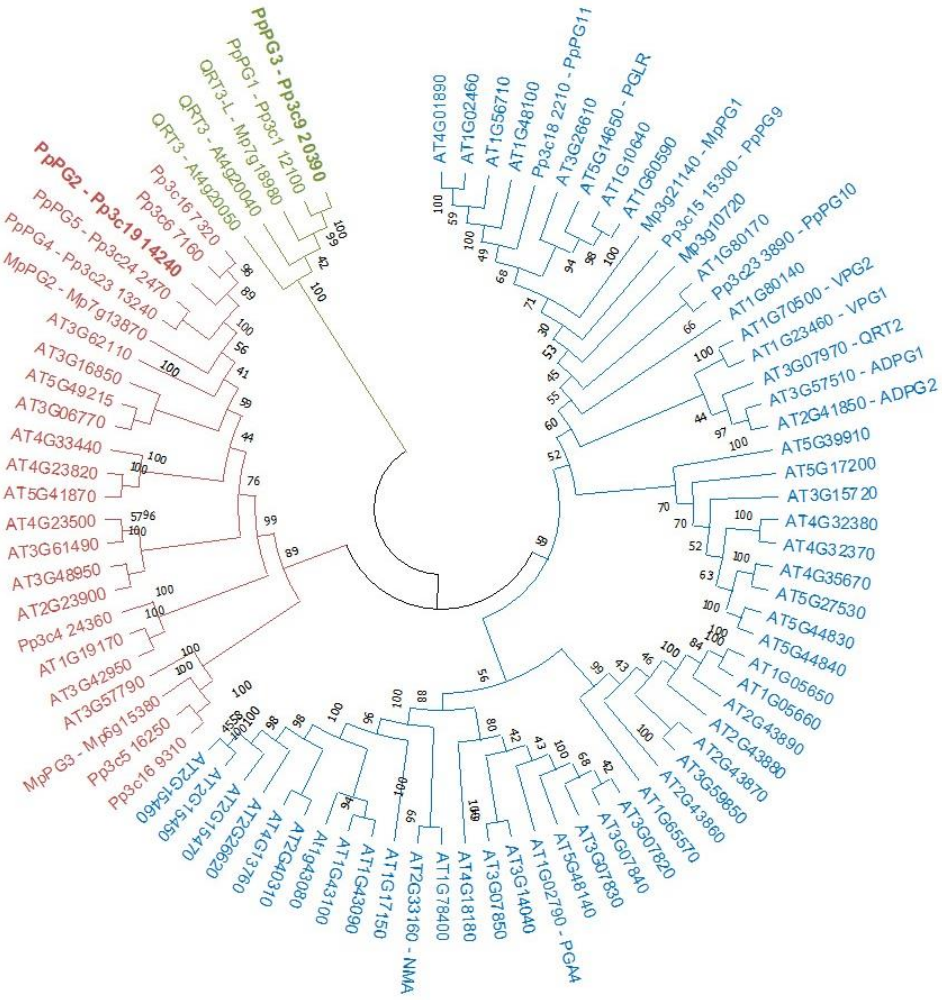


Figure 35 : Arbre phylogénétique des polygalacturonases de *Physcomitrium patens* (Pp), de *Marchantia polymorpha* (Mp) et d'*Arabidopsis thaliana* (At).

Cet arbre a été construit sur la base de similarité de séquence en acides aminés des 13 protéines identifiées comme probables polygalacturonases (PGs) chez *Physcomitrium patens*, des 5 PGs putatives de *Marchantia polymorpha* et des 68 PGs putatives d'*Arabidopsis thaliana*, toutes alignées selon l'algorithme ClustalW sur le logiciel MEGA X.

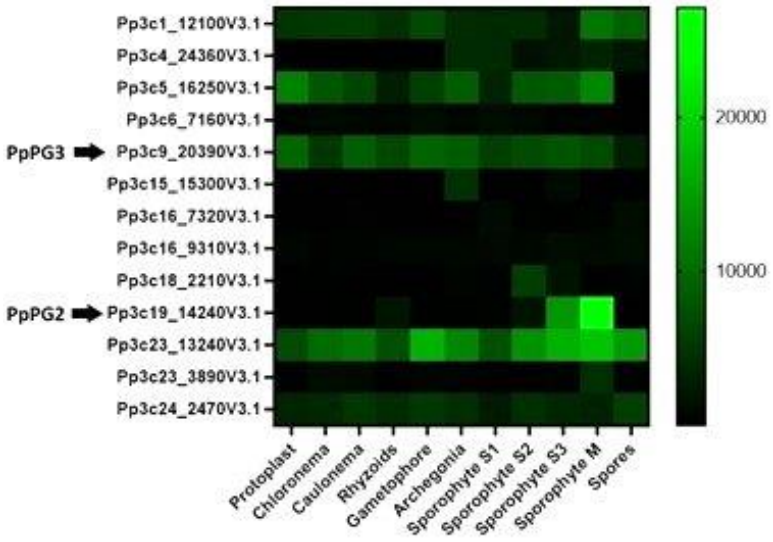
CHAPITRE II : LES POLYGALACTURONASES PpPG2 ET PpPG3

II.1. Les polygalacturonases de *Physcomitrium patens*

Les polygalacturonases étant responsables de la dépolymérisation des HGs, en considérant que leurs rôles dans le développement de *Physcomitrium patens* n'ont pas été caractérisés, nous nous concentrons sur l'étude des PGs de *P. patens*. La recherche de gènes codant pour les PGs chez *Physcomitrium patens* a été réalisée par homologie de séquence à l'aide de l'outil BLAST, à partir de plusieurs gènes *d'Arabidopsis thaliana* codant des endoPG et exoPG prédites. Ainsi, 13 gènes codant pour des protéines polygalacturonases potentielles ont été identifiés chez *Physcomitrium patens*. Suite à cela, un alignement des 13 séquences en acides aminés a été réalisé avec les 5 PGs putatives de *Marchantia polymorpha*, une autre bryophyte et les 68 PGs identifiées chez *Arabidopsis thaliana*, dans le but d'établir une première prédiction de structure en fonction des analogies de séquences. Pour la construction de l'arbre phylogénétique, la méthode Bootstrap a été sélectionnée sur 100 réplicats afin de définir un pourcentage de confiance pour chacune des branches de l'arbre. Sur l'arbre phylogénétique établi, présenté sur la **figure 35**, trois grandes familles semblent se distinguer. Dans la branche colorée en bleu, dans laquelle se trouvent Pp3c15_15300, Pp3c18_2210 et Pp3c23_3890, les PGs identifiées semblent être majoritairement des *endo*-polygalacturonases putatives, si l'on se réfère aux caractérisations biochimiques des PGs d'*Arabidopsis*. La branche rouge, regroupant Pp3c4_24360, Pp3c5_16250, Pp3c6_7160, Pp3c16_7320, Pp3c16_9310, Pp3c19_14240 (PpPG2), Pp3c23_13240 et Pp3c24_2470, semble regrouper des *exo*-polygalacturonases putatives. Tandis que la branche verte, comprenant Pp3c1_12100 et Pp3c9_20390 (PpPG3), regroupe les protéines qui présentent un Carbohydrate Binding Module (CBM), dont QRT3, dont l'activité polygalacturonase a été démontrée chez *Arabidopsis thaliana* (Rhee et al., 2003).

Les niveaux d'expression des 13 *PGs* de *Physcomitrium patens* ont été analysés grâce à la base de données PEATmoss qui regroupe les analyses transcriptomiques *P. patens*. Les données de niveaux d'expression en fonction des organes et stades de développement ont été regroupées dans la heatmap présentée en **figure 36 A**, en échelle de couleur de 0

A)



B)

	Protoplast	Chloronema	Caulonema	Rhyzoids	Gametophore	Archegonia	Sporophyte S1	Sporophyte S2	Sporophyte S3	Sporophyte M	Spores
PpPG2	30,37	165,21	226,94	1901,44	177,07	24,91	399,09	1817,79	14082,2	27127,7	24,75
PpPG3	9655,14	5291,64	8798,5	6850,34	9461,95	8554,66	5973,74	6975,23	7940,32	7067,14	2796,67

C) **D)**

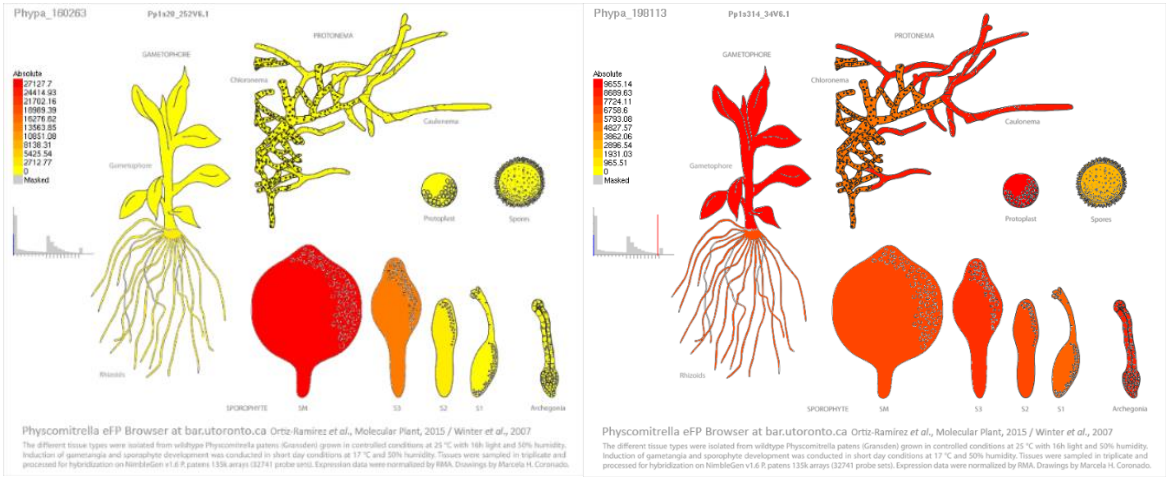


Figure 36 : Niveaux d'expression des polygalacturonases dans les différents organes de *Physcomitrium patens*.

A) Expression des PGs de *P. patens* dans ses différents organes sur une échelle FPKM (Fragment Per Kilobase of transcript per Million mapped fragments). **B)** Expression de *PpPG2* et *PpPG3* en FPKM. **C)** Représentation schématique de l'expression de *PpPG2* et **D)** *PpPG3* dans les organes et à différents stades de développement de *P. patens* sur une échelle en gradient de couleur obtenus dans la banque de donnée EFP Physcomitrella.

en noir à >2000 FPKM en vert. Le FPKM, abréviation de « Fragments Per Kilobase of exon model (or transcript) per Million mapped fragments », signifie le nombre de fragments par kilobase du transcrit par million de fragments cartographiés. Cette valeur permet de déterminer le niveau d'expression relatif d'un gène par rapport à une quantité massive de séquençage de transcrits, ainsi que de la longueur du gène en comparaison à la longueur des gènes transcrits. Le FPKM est une méthode alternative du TPM (Transcript Per Kilobase) qui ne prend pas en compte la longueur des gènes dans les calculs d'expressions.

Dans le cadre de la thèse, les gènes ***PpPG2*** (Pp3c19_14240) et ***PpPG3*** (Pp3c9_20390) ont été sélectionnés au vu de leurs différences de niveaux d'expression, mais également de la place sur l'arbre phylogénétique des protéines codées par ces gènes. Les valeurs d'expression des deux gènes sont indiquées dans le tableau en **figure 36 B**.

On remarque que *PpPG3* présente un niveau d'expression homogène dans la plupart des organes et à tous les stades de développement, avec un niveau moyen de 7215 FPKM, allant de 2796,67 FPKM au niveau des spores à 9655,15 FPKM au niveau des protoplastes. *PpPG2* est plus faiblement exprimé dans la plupart des organes à l'exception des sporophytes aux stades S3 et M (14.082,2 et 27.1127,7 FPKM respectivement). Si on ne prend en compte que la moyenne d'expression de ces PGs aux stades de développement gamétophytiques, avant le développement d'organes sexuels et du sporophyte, on obtient des moyennes d'expression de 420 et 7142 FPKM pour *PpPG2* et *PpPG3* respectivement. Les représentations schématiques de l'expression de ces gènes dans la plante sont présentées en **figure 36 C** et **D** pour *PpPG2* et *PpPG3* respectivement.

II.2. Analyses structurales de PpPG2 et PpPG3

Afin d'étudier les caractéristiques de PpPG2 et PpPG3, une analyse de leurs structures tri-dimensionnelles a été effectuée. Nous avons dans un premier temps utilisé Alphafold2 afin d'obtenir un modèle structural de chacune de ces enzymes (Jumper et al., 2021), puis celles-ci ont été représentées à l'aide du logiciel 3D Chimera X.

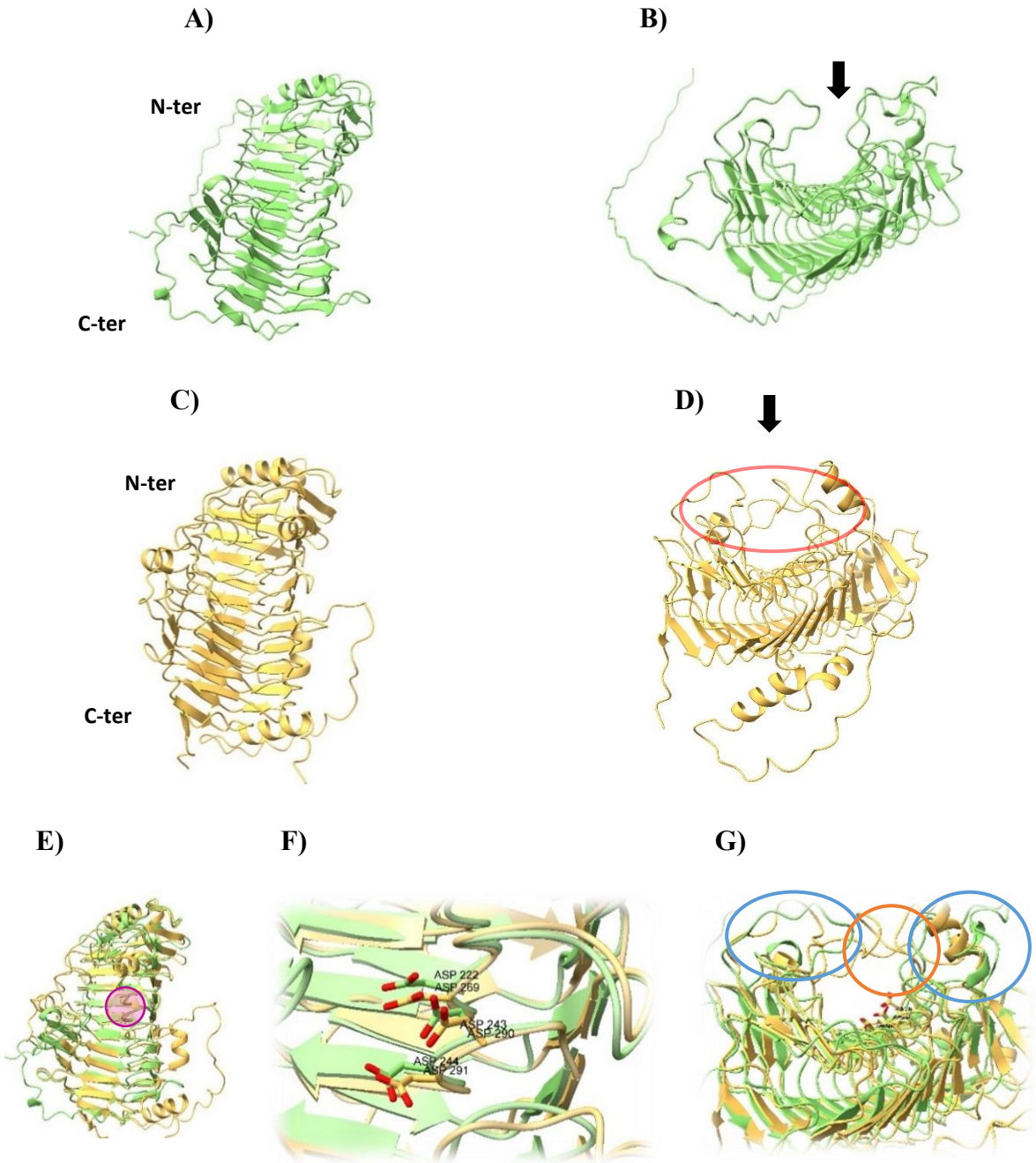


Figure 37 : Représentations tridimensionnelles en ruban des alignements des structures de PpPG2 et PGLR.

A) Vue de face de PGLR. **B)** Vue de dessous de PGLR. **C)** Vue de face de PpPG2. **D)** Vue de dessous de PpPG2. Le cercle rouge représente la troisième boucle au-dessus du tonneau β. **E)** Vue de face de l'alignement des structures de PpPG2 (jaune) et PGLR (vert). Le cercle violet indique l'emplacement des sites actifs (triades catalytiques). **F)** Représentation de la triade d'acides Aspartique des sites actifs de PpPG2 et PGLR. **G)** Vue de dessous de la localisation des sites actifs de PpPG2 et PGLR. Les cercles bleus montrent les deux boucles présentent sur les deux structures, tandis que le cercle orange montre la troisième boucle présente sur la structure de PpPG2.

Les modèles de structures tridimensionnelles de PpPG2 (en jaune) et PpPG3 (en rouge) sont présentés sur les **figures 37** et **38**, respectivement, et comparés à la structure de PGLR (en vert), une endo-polygalacturonase d'*Arabidopsis thaliana*, dont la structure, a été résolue par diffraction aux rayons X (Protein Data Bank 7B7A) et caractérisée au laboratoire (Safran et al., 2023). Les structures prédites de PpPG2 et PpPG3 correspondent aux descriptions des structures de polygalacturonases, puisqu'elles présentent, tout comme PGLR **(figure 37 A, C ; figure 38 A)** un tonneau de feuillets β, ou « tonneau β », typique des polygalacturonases. Chez PGLR, deux boucles sont présentes au-dessus de la poche du tonneau, la dépression où se trouve le site de liaison avec le substrat, laissant toutefois un espace vide présenté par la flèche sur la **figure 37 B**. Chez PpPG2, une troisième boucle est observable, encerclée en rouge sur la **figure 37 D**. Sa proximité avec la poche de liaison pourrait provoquer un encombrement stérique en limitant l'accès du substrat sur le site actif. Cette boucle semble être caractéristique des exo-polygalacturonases.

Concernant le mode d'action de ces protéines, le substrat, donc l'extrémité non réductrice des chaînes HG, se positionne au niveau des sous-sites dans la poche de liaison du tonneau β de la PG, s'aligne dans des sous-sites autour du site actif où sera réalisée l'hydrolyse. Des liaisons hydrogènes et interactions électrostatiques stabilisent la chaîne HG. La géométrie et la composition en acides aminés des sous-sites des PG déterminent la position et la mobilité du substrat, modulant l'action de la PG. Les boucles latérales contrôlent l'accès vers le site actif. Des boucles plus ouvertes favoriseraient l'accès et la mobilité du substrat, donc un potentiel mode d'action endo-PG. Tandis que des boucles fermées, ou trop proches du site actif, encombrant le tonneau β, limiteraient l'accès du substrat, conduisant à un potentiel mode d'action exo-PG. La structure de la PG, notamment la position des boucles, influerait sur la dynamique de l'enzyme et sa spécialisation fonctionnelle (Safran et al., 2023).

L'alignement des structures de PpPG2 (en jaune) et PGLR (en vert) présenté sur la **figure 37 E**, montre la forte similarité de structure entre ces deux protéines. Les trois acides aspartiques, acides aminés formant la triade catalytique des polygalacturonases, de PGLR, présentés en **figure 37 F**, notés Asp 222, Asp 243 et Asp 244, se trouvent alignés avec une même triade d'acides aspartiques sur PpPG2 (Asp 269, Asp 290 et Asp 291), ce qui suggère une hydrolyse identique. Leur mode d'action, cependant, devrait être différent, comme le suggère leurs différences structurales, présentées en **figure 37 G**, où l'on observe l'encombrement stérique de la boucle supplémentaire de PpPG2, encerclée en orange, en comparaison aux boucles de PGLR, encerclées en bleu.

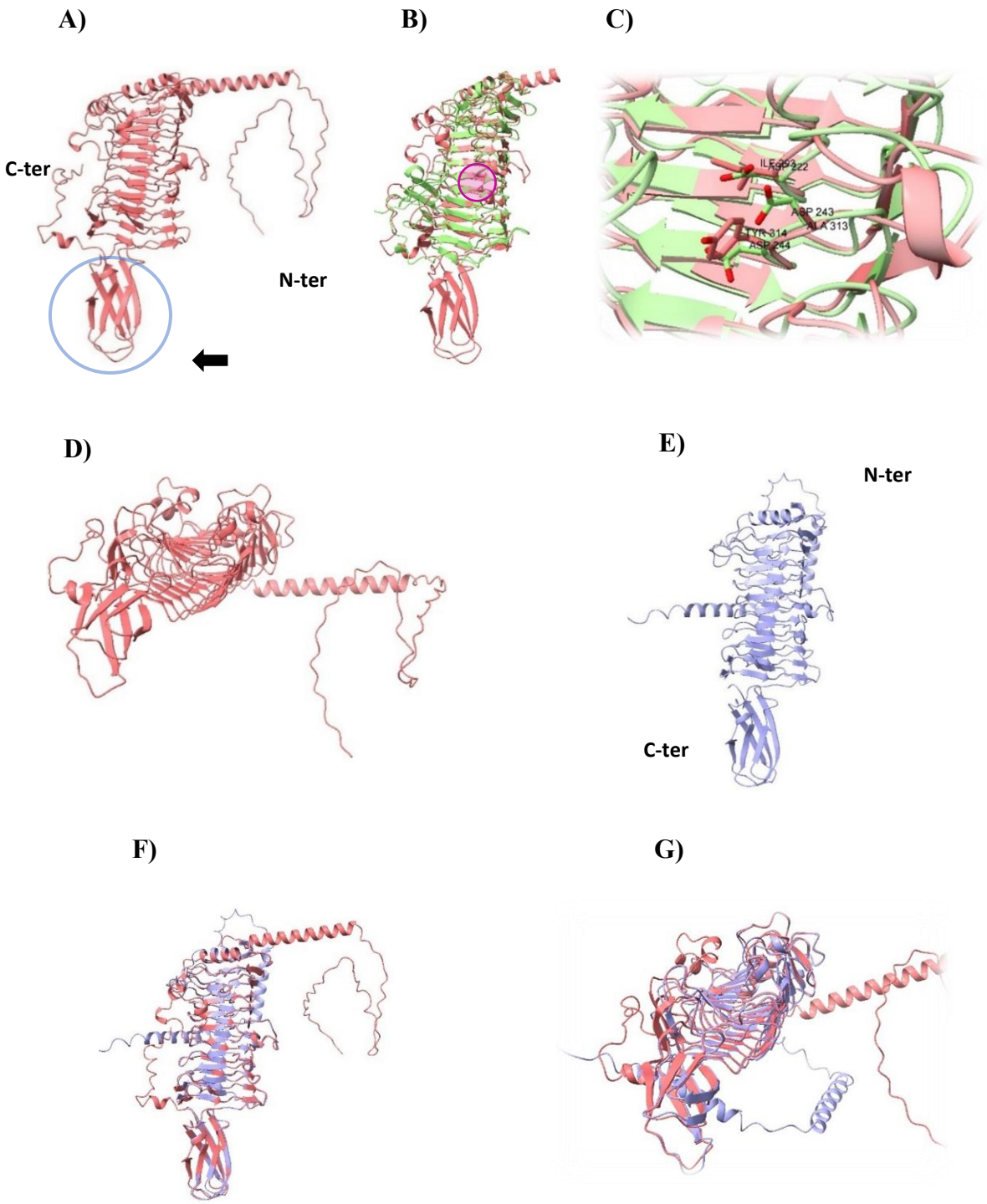


Figure 38 : Représentations tridimensionnelles en ruban des structures des protéines PpPG3, PGLR et QRT3.

A) Vue de face de PpPG3. **B)** Vue de face de l'alignement de structure de PpPG3 (rouge) et PGLR. Le cercle violet indique l'emplacement du site actif de PGLR. **C)** Comparaison des acides aminés du site actif de PGLR et les acides aminés alignés de PpPG3. **D)** Vue de dessous de PpPG3. **E)** Vue de face de QRT3 (mauve). **F)** Vue de face de l'alignement de structure de PpPG3 et QRT3. **G)** Vue de dessous de l'alignement de structure de PpPG3 et QRT3.

La structure de PpPG3 est présentée dans les **figures 38 A** et **D**. L'alignement des structures de PGLR et de PpPG3 est présenté en **figure 38 B**. La **figure 38 C** montre la triade catalytique, formée les trois acides aspartiques du site actif de PGLR, et leur absence chez PpPG3, pour laquelle l'alignement structural montre la présence de l'Isoleucine 293, l'Alanine 313 et la Tyrosine 314. Ceci peut révéler une probable différence dans le mode d'action. De plus, la structure de PpPG3 **(figure 38 A)** montre une sous-unité structurale située à l'extrémité C-terminale de la protéine, correspondant à un CBM (Carbohydrate Binding Module), qui joue un rôle dans la liaison avec le substrat. Le modèle structural d'un autre membre de la famille des polygalacturonases d'Arabidopsis, QRT3 (QUARTET3 ; At4g20050 ; UniProt O49432) **figure 38 E**, dont l'activité polygalacturonase a été démontrée (Rhee et al., 2003) a été comparé à celle de PpPG3. La superposition des structures de PpPG3 et QRT3 **figures 38 F** et **G**, montre une meilleure corrélation structurale de PpPG3 avec QRT3 plutôt qu'avec PGLR d'*Arabidopsis thaliana* ou PpPG2 de *Physcomitrium patens*. Ceci souligne que PpPG3 apparient aux QRT3-like au sein des PGs.

Des analyses comparatives entre ces séquences et structures ont été effectuées sur Chimera X afin de compléter l'étude structurale de ces protéines. Ces analyses permettent d'obtenir trois valeurs : 1) Le score d'alignement, qui correspond au score global de la qualité de l'alignement entre deux protéines. Ce score combine la similarité de séquences en acides-aminés et la similarité structurale des protéines alignées. Plus ce score est élevé, plus l'alignement est jugé correct par l'algorithme. Il n'a pas d'unité mais permet de comparer différents alignements. 2) Le RMSD (Root Mean Square Deviation), soit la déviation quadratique moyenne entre les positions atomiques après superposition. Il se base sur un nombre d'acides aminés alignés définis par le logiciel comme étant les plus conservés entre les deux structures alignées et donne la déviation moyenne des atomes de ces acides aminés, sans prendre en compte les parties divergentes. Cette valeur est représentée en Angström. Si le RMSD est < 1 Å, alors l'alignement entre les régions conservées des protéines est excellent. 3) Le RMSD Global, ou « Across all pairs », qui est un calcul de RMSD prenant en compte l'intégralité des atomes de tous les acides aminés alignés entre les deux structures. Il définit une moyenne globale de déviation des atomes. Plus le chiffre est grand, plus la différence structurale est importante.

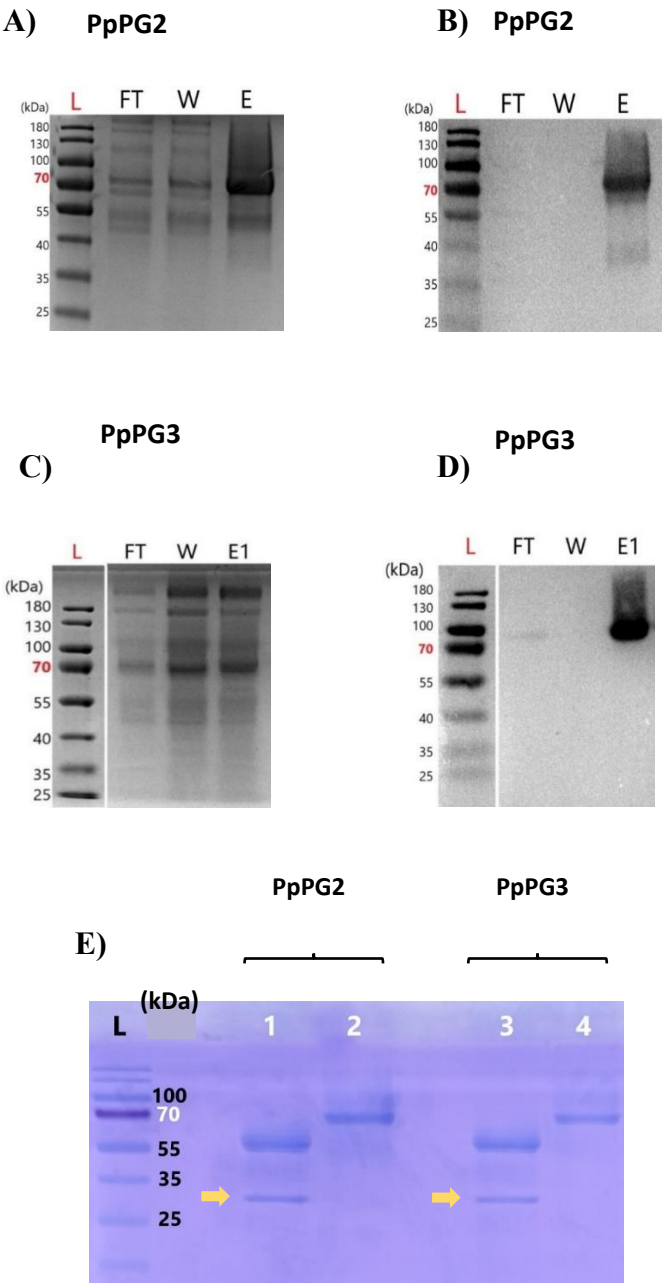


Figure 39 : Purification et activité de PpPG2 et PpPG3.

A) SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie des différentes fractions de purifications de PpPG2, FT (Flow-through), W (Wash) et E (Elution) qui contient la fraction purifiée de la protéine. **B)** Western blot de PpPG2 utilisant un anticorps anti-His tag HRP conjugué. **C)** SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie des différentes fractions de purifications de PpPG3, FT, Wash et Elution. **D)** Western blot de PpPG3 utilisant un anticorps anti-His tag HRP conjugué. **E)** SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie correspondant aux élutions de (1) PpPG2 traitée à la N-glycosidase, (2) PpPG2 non traitée, (3) PpPG3 traitée à la N-glycosidase et (4) PpPG3 non traitée. Les flèches jaunes correspondent à la taille attendue pour la N-glycosidase. (L) Marqueur de taille.

Ainsi, pour PpPG2, lorsqu'elle est alignée avec PpPG3, le score d'alignement est de 251,6. Il y a 115/398 paires d'acides aminés conservées entre les deux protéines, qui forment un noyau conservé ayant un RMSD de 0,954 Å, contre 17,966 Å de RMSD global. Cela signifie que ces deux protéines, PpPG2 et PpPG3, sont partiellement conservées mais présentent une forte divergence au global. A titre de comparaison, lorsque PpPG2 est alignée avec PGLR d'*Arabidopsis thaliana*, comme présenté en **figure 37 E**, le score d'alignement est de 560,9, donc supérieur à l'alignement PpPG2 et PpPG3. Il y a 272/393 paires d'acides aminés formant un noyau conservé de 0,877 Å de RMSD, pour un RMSD global de 18,784 Å. Ce qui signifie que PpPG2 et PGLR présentent une grande conservation malgré de grosses différences en périphérie du noyau conservé.

Pour PpPG3, lorsqu'elle est alignée avec PGLR d'*Arabidopsis thaliana*, le score d'alignement est de 208,6 donc plus faible que les alignements vus précédemment. Il y a 110/402 acides aminés conservés entre ces deux protéines, pour un RMSD de 0,876 Å, pour un RMSD de 30,433 Å. Ce qui signifie qu'il y a bien un petit noyau bien conservé entre ces deux protéines, mais la différence globale est extrêmement importante. Tandis qu'en comparaison, l'alignement entre PpPG3 et QRT3, comme présenté en **figures 38 F** et **G**, présente un score d'alignement largement supérieur de 1209,3. Un total de 382/447 acides aminés sont conservés, pour un RMSD de 0,522 Å, et un RMSD global de 20,254 Å. Ce qui signifie que la similarité de structure entre PpPG3 et QRT3 présente une grande conservation du noyau structurel, mais également des fortes différences sur la globalité de la structure. Là où, pour conclure les comparaisons, lorsque PpPG2 est aligné avec QRT3, le score d'alignement est de 247,7, soit le plus faible obtenu jusqu'à présent. Il n'y a que 141/397 acides aminés conservés, avec un RMSD de 0,961 Å, et un RMSD global de 21,914 Å. Ce qui signifie qu'en opposition à PpPG3, PpPG2 présente une divergence plus importante avec la protéine QRT3.

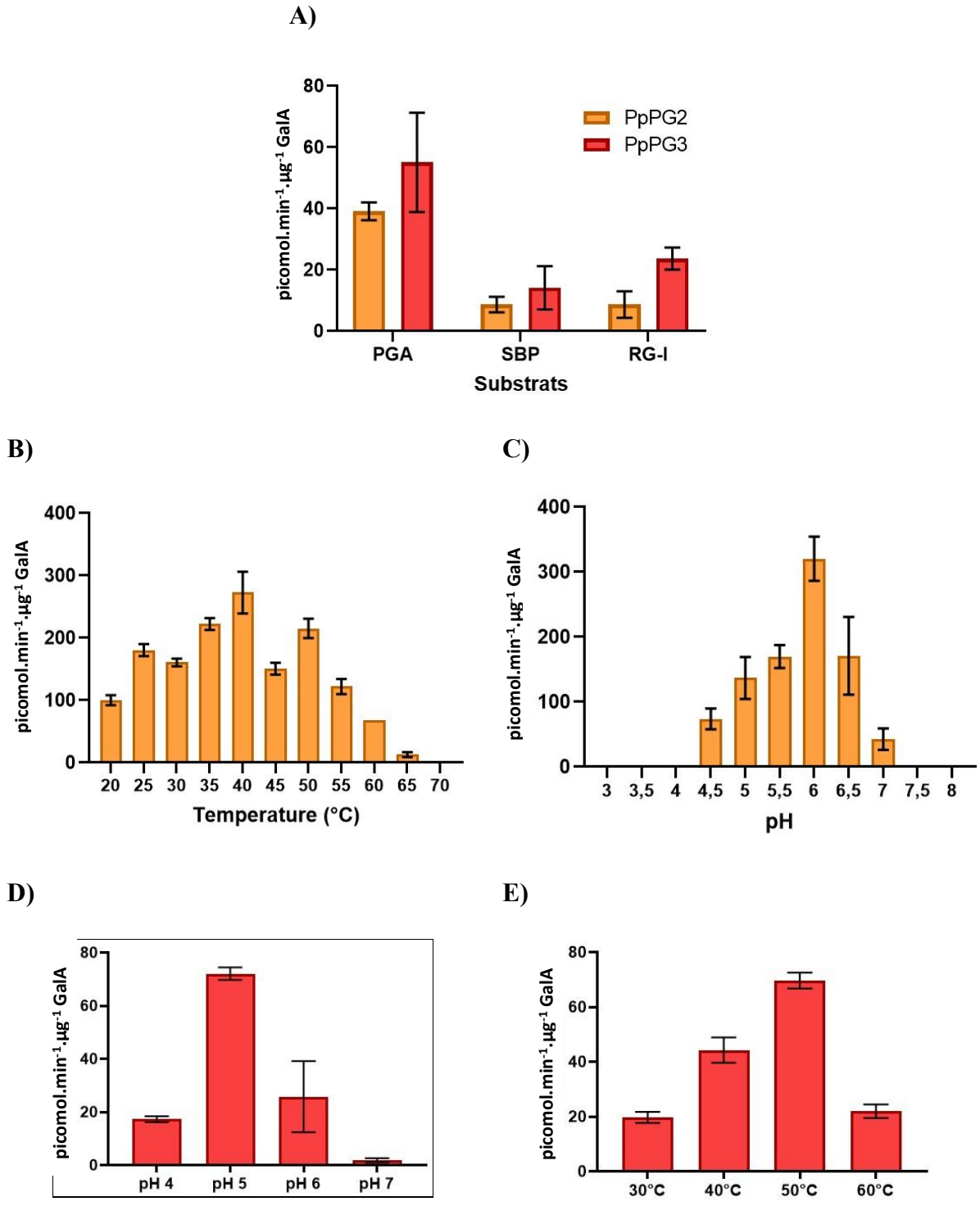


Figure 40 : Tests d'activité de PpPG2 et PpPG3.

A) Activité de PpPG2 et PpPG3 en picomol.µg^{-1}.min^{-1} sur PGA 1%, SBP (Sugar Beet Pectin) 1% et RG-I 1% à pH5,75 pendant 180 minutes à 50°C. **B)** Activité de PpPG2 en fonction de la température sur du PGA 1% à pH6 pendant 120 minutes. **C)** Activité de PpPG2 en fonction du pH sur du PGA 1% à différents pH, pendant 120 minutes à 40°C. **D)** Activité de PpPG3 en fonction du pH sur du PGA 1% à, pendant 240 minutes à 40°C. **E)** Activité de PpPG3 en fonction de la température sur du PGA 1% à pH5 pendant 240 minutes.

II.3. Production et caractérisation biochimique de PpPG2 et PpPG3

II.3.1. Production et purification

Les protéines PpPG2 et PpPG3 ont été produites dans le système hétérologue *Pichia pastoris* grâce au vecteur pPICZαB. Ce système permet l'induction de la production de protéine sa sécrétion, ce qui permet de récupérer les protéines d'intérêt dans le surnageant de culture, puis leur purification grâce au tag His fusionné en C-ter. Dans la construction transfectée dans *Pichia pastoris*, le gène produisant la protéine d'intérêt a été modifié, le signal peptide endogène ayant été retiré. Les clones de *P. pastoris* transformés sont mis en culture dans un milieu spécifique aux levures puis supplémenté en méthanol au deuxième, troisième et quatrième jour afin d'induire la production de la protéine hétérologue. Les différentes fractions récoltées à la sortie de la colonne de purification sont présentées dans les **figures 39 A**, **B**, **C** et **D**. Le FT (Flow-Through) correspond à la fraction des protéines du surnageant non retenues par la colonne de purification. La fraction W (Wash) correspond aux protéines faiblement accrochées sur la colonne de purification. Enfin, la fraction E (Elution) correspond à la fraction de protéines présentant une forte affinité pour la colonne de Nickel, donc enrichie en protéine d'intérêt.

Les protéines des différentes fractions ont été séparées par électrophorèse sur gel dénaturant, puis colorées au bleu de Coomassie pour révéler les protéines présentes dans les différentes fractions lors de l'induction de la production de PpPG2 **(figure 39 A)** et PpPG3 **(figure 39 C)**. Suite à leur transfert sur membrane, des anticorps spécifiques au tag His ont permis de détecter la présence de PpPG2 **(figure 39 B)**, et PpPG3 **(figure 39 D)**. La taille observée de ces protéines est d'environ 70 kDa, soit supérieure à ce qui est attendu pour PpPG2 qui est de 52,3 kDa (50,3 kDa + 2 kDa en comptant le tag His, 0,8kDa, et le c-myc, 1,2kDa) et PpPG3 58,5 kDa (56,5 kDa + 2 kDa 6xHis+c-myc). Les protéines purifiées ont été déglycosylées par la PNGase, spécifique des N-glycosylations puisque les N-glycosylations et O-glycosylations des protéines peuvent faire varier la masse des protéines. La **figure 39 E** montre un décalage dans la migration de PpPG2 et PpPG3 après déglycosylation, avec des protéines observées à la taille attendue, soit entre 55 et 60 kDa. Ces résultats sont cohérents avec l'analyse bioinformatique des séquences par NetNglyc 1.0, qui prédit 7 sites de N-glycosylation potentiels et par NetOglyc 4.0, qui prédit 5 sites de O-glycosylation potentiels. Pour PpPG3, sont prédits 2 sites de N-glycosylation potentiels, ainsi que 5 sites de O-glycosylation potentiels.

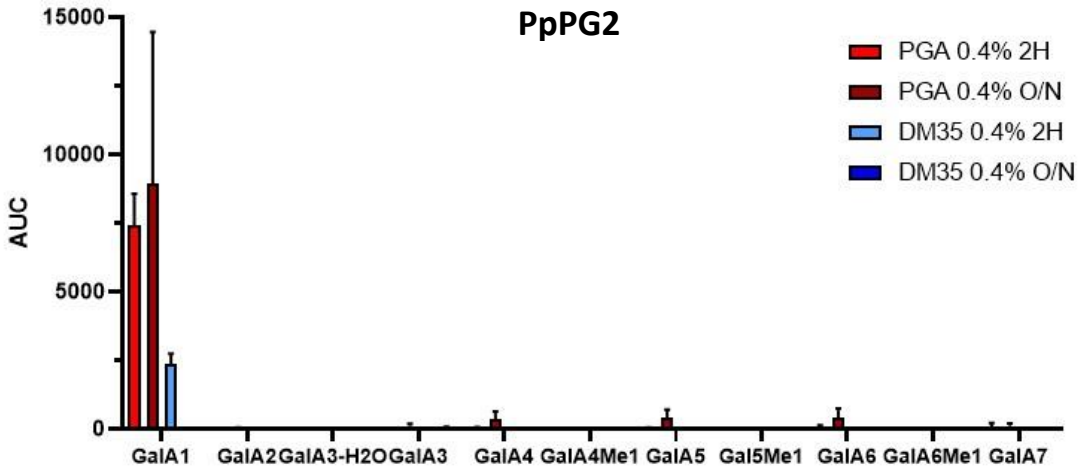
II.3.2. Activité polygalacturonase

Pour évaluer l'activité et la spécificité de substrats des protéines PpPG2 et PpPG3, différents substrats ont été utilisés : le PGA, les SBP et la RG-I **(figure 40 A)**. Le PGA est un substrat commercial d'acides polygalacturoniques non estérifiés. Le SBP (Sugar Beet Pectin) est un substrat commercial composé d'un mélange de pectines HG et RG-I, et présente un degré de méthylation de 42% et un degré d'acétylation de 31%. Enfin, le RG-I est un substrat commercial de rhamnogalacturonane de type I de pomme de terre. Les activités des deux enzymes sur ces trois substrats ont été réalisées à pH5,75 pendant 180 minutes à 50°C. PpPG2 et PpPG3 montrent toutes les deux une activité supérieure pour le PGA par rapport aux autres substrats. Lorsqu'elle est testée sur du PGA, PpPG2 a une activité PG moyenne de 39,11 picomoles.μg^{-1}.min^{-1} contre seulement 8,69 picomoles.μg^{-1}.min^{-1} pour les substrats SBP et RG-I. Concernant PpPG3, son activité PG moyenne sur PGA est de 55,09 picomoles.μg^{-1}.min^{-1}, contre 14,15 picomoles.μg^{-1}.min^{-1} et 23,68 picomoles.μg^{-1}.min^{-1} pour les substrats SBP et RG-I respectivement.

II.3.3. Détermination des températures et pH optimums

Afin de déterminer quelles sont les conditions optimales d'activité de ces protéines, l'activité enzymatique a été mesurée en utilisant le PGA comme substrat, à différents températures et pH. Un premier test de température d'activité optimale, présenté sur la **figure 40 B**, a été effectué sur PpPG2 sur du PGA 1%, à pH 5,75, pendant 60 minutes de digestion, pour 11 températures (20°C à 70°C par paliers de 5°C). Ainsi, le pic d'activité se trouve à 40°C, avec une moyenne de Gal-A produits de 272,82 picomoles.μg^{-1}.min^{-1} pour PpPG2. Cette température, optimale pour l'activité de PpPG2, a été utilisée pour déterminer son pH optimal d'activité par digestion de PGA 1% à différents pH, pendant 60 minutes d'incubation à 40°C, sur une gamme de 11 pH (pH 3 à pH 8), **figure 40 C**. Le maximum d'activité a été déterminé à pH 6, avec une moyenne de 320 picomoles.μg^{-1}.min^{-1} pour PpPG2.

A)



B)

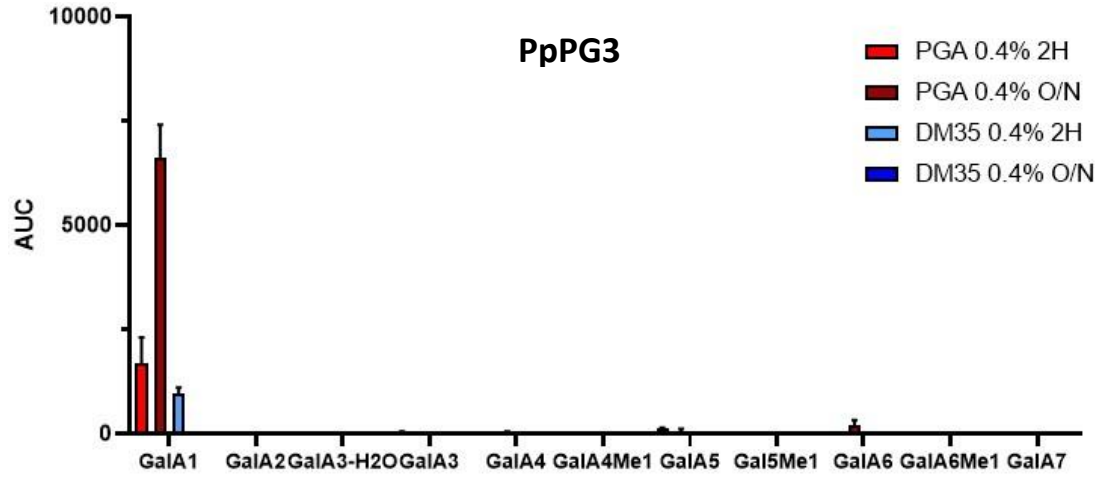


Figure 41 : Oligoprofilage des produits de digestion de PpPG2 et PpPG3 analysés par LC-MS.

A) AUC (Area under curve) des OGs identifiés suite à la digestion de PGA 0,4% (rouge) et DM35 0,4% (bleu) par PpPG2 durant 2 heures (2H, clair) et overnight (O/N, foncé). **B)** AUC des OGs identifiés suite à la digestion de PGA 0,4% (rouge) et DM35 0,4% (bleu) par PpPG3 durant 2 heures (2H, clair) et overnight (O/N, foncé).

La détermination du pH optimal de PpPG3 présenté en **figure 40 D**, a été effectué sur du PGA à 1% de concentration finale pour 4 pH différents (pH 4, 5, 6 et 7), pendant 240 minutes de digestion à 40°C. Le pic d'activité est déterminé à pH 5, avec une moyenne de 72,11 picomoles.μg^{-1}.min^{-1} de PpPG3. Ce pH optimal pour l'activité de PpPG3, a été utilisée pour confirmer la température optimale d'activité. Comme présenté dans la **figure 40 E**, la digestion de PGA 1% s'est effectuée pendant 240 minutes d'incubation à pH 5, pour 4 températures différentes (30°C, 40°C, 50°C et 60°C). Le maximum d'activité a été observé à 50°C, avec une moyenne de 69,68 picomoles.μg^{-1}.min^{-1} pour PpPG3.

II.3.4. Caractérisation du mode d'action par oligoprofilage

Afin de poursuivre la caractérisation biochimique de PpPG2 et PpPG3 et de déterminer leur mode d'action endo- ou exo-polygalacturonase, un profilage des produits de digestion a été réalisé par méthode LC/MS-MS. Deux substrats ont été utilisés, le PGA et des HGs méthylestérifiées à 35% (DM35). Pour les deux protéines et ces deux substrats, deux durées de digestions ont été testées, 2 heures et toute une nuit (overnight, O/N). Les résultats pour PpPG2, présentés sur la **figure 41 A**, obtenus en AUC (area under curve) montrent une majorité de GalA1 (une unité de GalA) produit à partir de PGA pendant des digestions de 2h et O/N, avec des AUC moyenne de 7406,26 et 8942,46, respectivement. La digestion du DM35 par PpPG2 pendant 2h montre, quant à elle, une faible production de GalA1 avec une AUC de 2360,75. Concernant PpPG3, les résultats de l'oligoprofilage présentés sur la **figure 41 B**, montrent également une production majoritaire de GalA1, avec des AUC moyennes de 1687,54 pour les produits de digestion du PGA pendant 2h, 6605,37 pour les produits de digestion du PGA O/N, contre seulement 950,65 pour les produits de digestion du DM35 pendant deux heures. L'ensemble de ces résultats permet de déterminer que les deux enzymes PpPG2 et ppPG3 ont un mode d'action exo. Les traces de hauts DPs doivent être des fragments résiduels constitutifs du substrat utilisé.

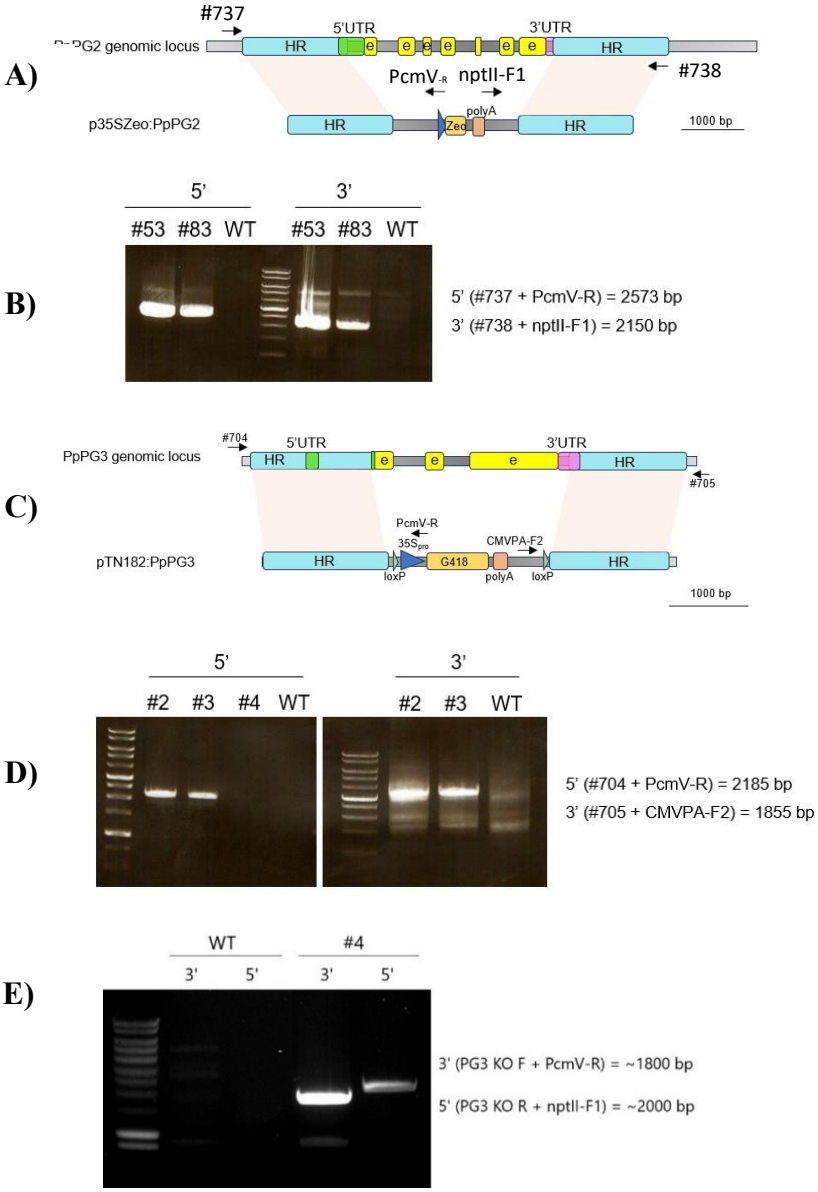


Figure 42 : Génotypage des mutants *pppg2*, *pppg3* et du double mutant *pppg2/pppg3*.

A) Schéma de la construction p35SZeo:PpPG2 utilisée pour le remplacement du gène *PpPG2* par recombinaison homologue. **B)** Génotypage par PCR des clones #53 et #83 obtenus après recombinaison homologue en utilisant les amorces #737 et PcmV-R pour l'extrémité 5' ; et #738 et nptII-F1 pour l'extrémité 3'. **C)** Schéma de la construction pTN182:PpPG3 utilisée pour le remplacement du gène *PpPG3* par recombinaison homologue. **D)** Génotypage par PCR des clones #2 et #3 obtenus après recombinaison homologue en utilisant les amorces #704 et PcmV-R pour l'extrémité 5' ; et #705 et CMVPA-F2 pour l'extrémité 3'. **E)** Génotypage du clone #4 (double mutant *pppg2, pppg3*) après recombinaison homologue de *pppg3*, dans le fond génétique du mutant *pppg2*, vérifiés après PCR avec les primers adéquats 'PG3 KO F', situé en amont de la région 5'UTR sur l'ADN génomique, et PcmV-R pour l'extrémité 5' ; et 'PG3KO R', situé en aval de la région 3'UTR sur l'ADN génomique, et nptII-F1 pour l'extrémité 3'.

II.4. Mutants knock-out de *pppg2* et *pppg3*

II.4.1. Génotypages de vérification

Afin d'étudier la fonction des gènes *PpPG2* et *PpPG3* et donc l'effet de ces protéines sur l'organisme *Physcomitrium patens*, une approche de génomique fonctionnelle a été réalisée. Pour cela, des mutants ont été générés et caractérisés. Une stratégie de remplacement de gène par recombinaison homologue a été mise en œuvre à l'aide des constructions moléculaires présentées en **figures 42 A** et **C**. La transformation a été effectuée sur des protoplastes de *Physcomitrium patens* sauvage, afin d'obtenir des mutants perte de fonction pour les gènes *PpPG2* et *PpPG3*. Les mutants knock-out obtenus sont respectivement nommés *pppg2* et *pppg3*. Des extractions d'ADN ont été effectués sur les différents clones obtenus afin de les génotyper en réalisant des PCR au niveau des sites de recombinaisons des extrémités 5'et 3' **(figures 42 B** et **D)**, pour les mutants *pppg2* et *pppg3* respectivement. Les clones positifs *pppg2*, présentés sur la **figure 42 B**, ainsi que les clones positifs *pppg3*, présentés sur la **figure 42 D**, ont été vérifiés par PCR aux extrémités 5' et 3' des gènes d'intérêt afin de confirmer le remplacement du gène par la construction. Enfin, le double mutant *pppg2/pppg3* a été obtenu par recombinaison homologue avec la construction *pppg3* dans le fond mutant *pppg2*. Son génotypage, présenté dans la **figure 42 E**, s'est fait par PCR aux extrémités 5' et 3' du gène *PpPG3* pour confirmer le remplacement de ce gène par la construction dans les clones *pppg2*.

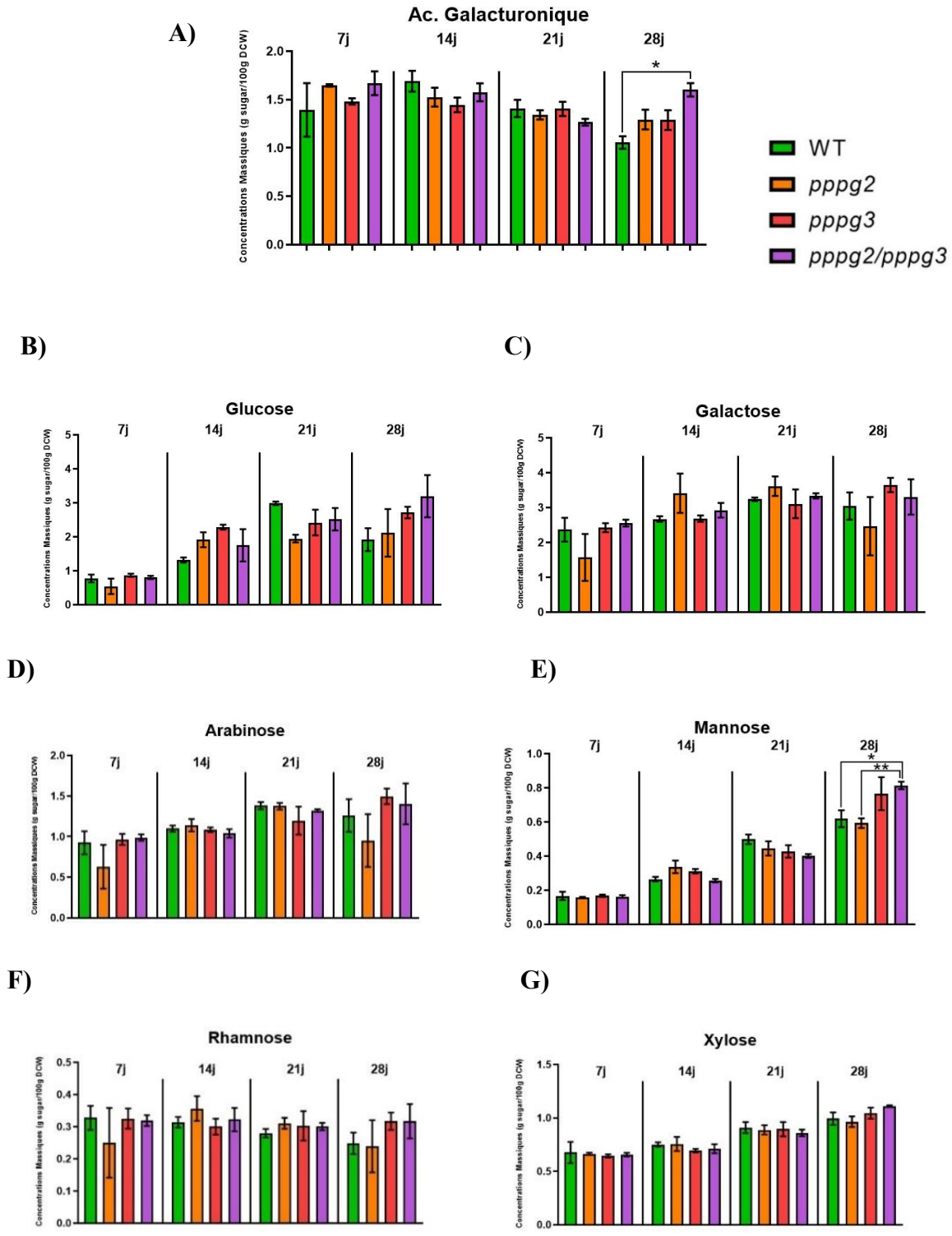


Figure 43 : Identification des monosaccharides constitutifs de la paroi cellulaire du génotype sauvage et des mutants *pppg2*, *pppg3* et *pppg2/pppg3* à 7, 14, 21 et 28 jours de développement par HPAEC.

Concentration massique (gramme de sucre pour 100g de masse sèche) à 7j, 14j, 21j, et 28 jours (n=4) pour **A)** acide galacturonique (*p value = 0,0420) ; **B)** glucose **; C)** galactose **; D)** arabinose **; E)** mannose (*p value = 0,0206), (**p value = 0,0044) **; F)** de rhamnose **; G)** et xylose. Seules les différences significatives entre génotypes au même stade de développement sont représentées.

II.4.2. Composition des parois des mutants *pppg2*, *pppg3* et *pppg2/pppg3*

II.4.2.1. Détermination de la composition en monosaccharide

Afin d'étudier la composition en sucres de la paroi cellulaire des mutants *pppg2*, *pppg3* et *pppg2/pppg3* de *Physcomitrium patens*, les parois cellulaires ont été préparées pour être analysées par chromatographie ionique à haute performance. Cette méthode permet de séparer et d'identifier différents monosaccharides neutres ou acides constitutifs des polysaccharides pariétaux végétaux après hydrolyse acide. Par cette méthode, les trois mutants, ainsi que le sauvage (WT) ont été étudiés au cours d'une cinétique de développement : 7, 14, 21 et 28 jours de croissance après repiquage. Les différents monosaccharides analysés témoignent de la composition de la paroi cellulaire de ces mutants à ces différents stades (n=4) et sont présentés **figure 43**.

Pour l'acide galacturonique, présenté en **figure 43 A**, composant principal des pectines, la concentration massique varie en moyenne entre 1,05 et 1,69 gramme pour 100 grammes de matière sèche de paroi cellulaire (DCW) et ne semble pas varier au cours du temps, ni entre les différents mutants vis-à-vis du sauvage (WT). Seule la condition sauvage à 28 jours de croissance montre une différence significative, après une analyse de variance à deux facteurs (Two-way ANOVA), entre le sauvage et le double mutant *pppg2/pppg3* (p value = 0,0420). Par ailleurs, d'autres différences significatives sont mesurées chez le sauvage entre 14 jours et 28 jours de croissance (p value = 0,0075), mais également entre le sauvage à 28 jours et la condition *pppg2* à 7 jours (p value = 0,0181), puis entre le sauvage à 28 jours et *pppg2/pppg3* à 7 jours (p value = 0,0117).

Les résultats relatifs au glucose, composant de la cellulose et des hémicelluloses, est présenté en **figure 43 B**. Pour chaque mutant à chaque temps de croissance, la concentration massique de glucose varie entre 0,54 et 3,19 g/100g DCW et une tendance à l'augmentation de la quantité de glucose au cours du temps, chez tous les génotypes, est observée. Aux jours 14 et 28, la concentration massique de glucose semble être plus importante chez les 3 mutants comparés au sauvage. Le test Two-way ANOVA montre une augmentation significative de concentration massique de glucose entre J7 et J21 (p value = 0,0012) pour le sauvage mais pas avec les autres conditions.

Tableau 1 : Ensemble des différences significatives entre les concentrations massiques des différents monosaccharides de la paroi des mutants *pppg2*, *pppg3*, *pppg2/pppg3* et du sauvage, à 7j, 14j, 21j et 28 jours de développement (Multiple comparaison Two-Way

Monosaccharide								
Echantillons A et B comparés	*Signification*	*P value ajustée*	*Echantillons A et B comparés*	*Signification*	*P value ajustée*	*Echantillons A et B comparés*	*Signification*	*P value ajustée*
Acide Galacturonique								
7j.pg2 vs. 28j.wt	*	0,0181	7j.pg2pg3 vs. 28j.wt	*	0,0117	14j.wt vs. 28j.wt	**	0,0075
28j.wt vs. 28j.pg2pg3	*	0,042	-	-	-	-	-	-
Acide Glucuronique								
7j.wt vs. 14j.wt	*	0,0152	7j.pg3 vs. 28j.pg2	****	<0,0001	14j.pg2 vs. 28j.pg2	****	<0,0001
7j.wt vs. 21wt	****	<0,0001	7j.pg3 vs. 28j.pg3	****	<0,0001	14j.pg2 vs. 28j.pg3	****	<0,0001
7j.wt vs. 21j.pg2	****	<0,0001	7j.pg3 vs. 28j.pg2pg3	****	<0,0001	14j.pg2 vs. 28j.pg2pg3	****	<0,0001
7j.wt vs. 21j.pg3	****	<0,0001	7j.pg2pg3 vs. 21wt	****	<0,0001	14j.pg3 vs. 21wt	****	<0,0001
7j.wt vs. 21j.pg2pg3	****	<0,0001	7j.pg2pg3 vs. 21j.pg2	***	0,0002	14j.pg3 vs. 21j.pg2	*	0,0153
7j.wt vs. 28j.wt	****	<0,0001	7j.pg2pg3 vs. 21j.pg3	****	<0,0001	14j.pg3 vs. 21j.pg3	****	<0,0001
7j.wt vs. 28j.pg2	****	<0,0001	7j.pg2pg3 vs. 21j.pg2pg3	****	<0,0001	14j.pg3 vs. 21j.pg2pg3	****	<0,0001
7j.wt vs. 28j.pg3	****	<0,0001	7j.pg2pg3 vs. 28j.wt	****	<0,0001	14j.pg3 vs. 28j.wt	****	<0,0001
7j.wt vs. 28j.pg2pg3	****	<0,0001	7j.pg2pg3 vs. 28j.pg2	****	<0,0001	14j.pg3 vs. 28j.pg2	****	<0,0001
7j.pg2 vs. 21wt	****	<0,0001	7j.pg2pg3 vs. 28j.pg3	****	<0,0001	14j.pg3 vs. 28j.pg3	****	<0,0001
7j.pg2 vs. 21j.pg2	***	0,0008	7j.pg2pg3 vs. 28j.pg2pg3	****	<0,0001	14j.pg3 vs. 28j.pg2pg3	****	<0,0001
7j.pg2 vs. 21j.pg3	****	<0,0001	14j.wt vs. 21wt	****	<0,0001	14j.pg2pg3 vs. 21wt	****	<0,0001
7j.pg2 vs. 21j.pg2pg3	****	<0,0001	14j.wt vs. 21j.pg3	****	<0,0001	14j.pg2pg3 vs. 21j.pg3	****	<0,0001
7j.pg2 vs. 28j.wt	****	<0,0001	14j.wt vs. 21j.pg2pg3	*	0,0247	14j.pg2pg3 vs. 21j.pg2pg3	**	0,0066
7j.pg2 vs. 28j.pg2	****	<0,0001	14j.wt vs. 28j.wt	*	0,0149	14j.pg2pg3 vs. 28j.wt	**	0,0038
7j.pg2 vs. 28j.pg3	****	<0,0001	14j.wt vs. 28j.pg2	****	<0,0001	14j.pg2pg3 vs. 28j.pg2	****	<0,0001
7j.pg2 vs. 28j.pg2pg3	****	<0,0001	14j.wt vs. 28j.pg3	****	<0,0001	14j.pg2pg3 vs. 28j.pg3	****	<0,0001
7j.pg3 vs. 14j.wt	*	0,0301	14j.wt vs. 28j.pg2pg3	****	<0,0001	14j.pg2pg3 vs. 28j.pg2pg3	****	<0,0001
7j.pg3 vs. 21wt	****	<0,0001	14j.pg2 vs. 21wt	****	<0,0001	21wt vs. 21j.pg2	**	0,0031
7j.pg3 vs. 21j.pg2	****	<0,0001	14j.pg2 vs. 21j.pg2	**	0,0087	21j.pg2 vs. 21j.pg3	**	0,0095
7j.pg3 vs. 21j.pg3	****	<0,0001	14j.pg2 vs. 21j.pg3	****	<0,0001	21j.pg2 vs. 28j.pg2	**	0,0078
7j.pg3 vs. 21j.pg2pg3	****	<0,0001	14j.pg2 vs. 21j.pg2pg3	****	<0,0001	21j.pg2 vs. 28j.pg3	***	0,0007
7j.pg3 vs. 28j.wt	****	<0,0001	14j.pg2 vs. 28j.wt	****	<0,0001	21j.pg2 vs. 28j.pg2pg3	***	0,0002
Fucose								
7j.wt vs. 28j.pg3	**	0,0048	7j.pg2 vs. 28j.pg3	***	0,0002	7j.pg2pg3 vs. 28j.pg3	*	0,032
7j.wt vs. 28j.pg2pg3	*	0,043	7j.pg2 vs. 28j.pg2pg3	**	0,0029	14j.wt vs. 28j.pg3	*	0,044
7j.pg2 vs. 21j.pg2	*	0,0255	7j.pg3 vs. 28j.pg3	*	0,0127	14j.pg2pg3 vs. 28j.pg3	*	0,0375
Glucose								
7j.wt vs. 21wt	**	0,0012	7j.pg2 vs. 21j.pg3	*	0,0118	7j.pg3 vs. 28j.pg2pg3	***	0,0005
7j.wt vs. 21j.pg3	*	0,0479	7j.pg2 vs. 21j.pg2pg3	**	0,0062	7j.pg2pg3 vs. 21wt	**	0,0014
7j.wt vs. 21j.pg2pg3	*	0,0266	7j.pg2 vs. 28j.pg3	**	0,0016	7j.pg2pg3 vs. 21j.pg2pg3	*	0,0319
7j.wt vs. 28j.pg3	**	0,0077	7j.pg2 vs. 28j.pg2pg3	****	<0,0001	7j.pg2pg3 vs. 28j.pg3	**	0,0094
7j.wt vs. 28j.pg2pg3	***	0,0003	7j.pg3 vs. 21wt	**	0,0023	7j.pg2pg3 vs. 28j.pg2pg3	***	0,0003
7j.pg2 vs. 14j.pg3	*	0,0274	7j.pg3 vs. 21j.pg2pg3	*	0,0474	14j.wt vs. 21wt	*	0,0416
7j.pg2 vs. 21wt	***	0,0002	7j.pg3 vs. 28j.pg3	*	0,0145	14j.wt vs. 28j.pg2pg3	*	0,0115
Galactose								
7j.pg2 vs. 21j.pg2	*	0,0355	7j.pg2 vs. 28j.pg3	*	0,0297	-	-	-

Monosaccharide								
Echantillons A et B comparés	*Signification*	*P value ajustée*	*Echantillons A et B comparés*	*Signification*	*P value ajustée*	*Echantillons A et B comparés*	*Signification*	*P value ajustée*
Mannose								
7j.wt vs. 21wt	****	<0,0001	7j.pg3 vs. 28j.pg3	****	<0,0001	14j.pg3 vs. 28j.pg3	****	<0,0001
7j.wt vs. 21j.pg2	***	0,0001	7j.pg3 vs. 28j.pg2pg3	****	<0,0001	14j.pg3 vs. 28j.pg2pg3	****	<0,0001
7j.wt vs. 21j.pg3	***	0,0003	7j.pg2pg3 vs. 21wt	****	<0,0001	14j.pg2pg3 vs. 21wt	**	0,0011
7j.wt vs. 21j.pg2pg3	**	0,002	7j.pg2pg3 vs. 21j.pg2	****	<0,0001	14j.pg2pg3 vs. 21j.pg2	*	0,0303
7j.wt vs. 28j.wt	****	<0,0001	7j.pg2pg3 vs. 21j.pg3	***	0,0003	14j.pg2pg3 vs. 28j.wt	****	<0,0001
7j.wt vs. 28j.pg2	****	<0,0001	7j.pg2pg3 vs. 21j.pg2pg3	**	0,0016	14j.pg2pg3 vs. 28j.pg2	****	<0,0001
7j.wt vs. 28j.pg3	****	<0,0001	7j.pg2pg3 vs. 28j.wt	****	<0,0001	14j.pg2pg3 vs. 28j.pg3	****	<0,0001
7j.wt vs. 28j.pg2pg3	****	<0,0001	7j.pg2pg3 vs. 28j.pg2	****	<0,0001	14j.pg2pg3 vs. 28j.pg2pg3	****	<0,0001
7j.pg2 vs. 14j.pg2	*	0,0478	7j.pg2pg3 vs. 28j.pg3	****	<0,0001	21wt vs. 28j.pg3	***	0,0002
7j.pg2 vs. 21wt	****	<0,0001	7j.pg2pg3 vs. 28j.pg2pg3	****	<0,0001	21wt vs. 28j.pg2pg3	****	<0,0001
7j.pg2 vs. 21j.pg2	****	<0,0001	14j.wt vs. 21wt	**	0,002	21j.pg2 vs. 28j.pg3	****	<0,0001
7j.pg2 vs. 21j.pg3	***	0,0002	14j.wt vs. 21j.pg2	*	0,0485	21j.pg2 vs. 28j.pg2pg3	****	<0,0001
7j.pg2 vs. 21j.pg2pg3	**	0,001	14j.wt vs. 28j.wt	****	<0,0001	21j.pg3 vs. 28j.wt	*	0,0253
7j.pg2 vs. 28j.wt	****	<0,0001	14j.wt vs. 28j.pg2	****	<0,0001	21j.pg3 vs. 28j.pg3	****	<0,0001
7j.pg2 vs. 28j.pg2	****	<0,0001	14j.wt vs. 28j.pg3	****	<0,0001	21j.pg3 vs. 28j.pg2pg3	****	<0,0001
7j.pg2 vs. 28j.pg3	****	<0,0001	14j.wt vs. 28j.pg2pg3	****	<0,0001	21j.pg2pg3 vs. 28j.wt	**	0,0051
7j.pg2 vs. 28j.pg2pg3	****	<0,0001	14j.pg2 vs. 28j.wt	****	<0,0001	21j.pg2pg3 vs. 28j.pg2	*	0,0237
7j.pg3 vs. 21wt	****	<0,0001	14j.pg2 vs. 28j.pg2	***	0,0004	21j.pg2pg3 vs. 28j.pg3	****	<0,0001
7j.pg3 vs. 21j.pg2	***	0,0001	14j.pg2 vs. 28j.pg3	****	<0,0001	21j.pg2pg3 vs. 28j.pg2pg3	****	<0,0001
7j.pg3 vs. 21j.pg3	***	0,0004	14j.pg2 vs. 28j.pg2pg3	****	<0,0001	28j.wt vs. 28j.pg2pg3	*	0,0206
7j.pg3 vs. 21j.pg2pg3	**	0,0021	14j.pg3 vs. 21wt	*	0,032	28j.pg2 vs. 28j.pg2pg3	**	0,0044
7j.pg3 vs. 28j.wt	****	<0,0001	14j.pg3 vs. 28j.wt	****	<0,0001	-	-	-
7j.pg3 vs. 28j.pg2	****	<0,0001	14j.pg3 vs. 28j.pg2	****	<0,0001	-	-	-
Xylose								
7j.wt vs. 28j.wt	**	0,0021	7j.pg3 vs. 21j.pg3	*	0,0384	14j.pg2 vs. 28j.pg3	**	0,0076
7j.wt vs. 28j.pg2	**	0,0077	7j.pg3 vs. 28j.wt	***	0,0004	14j.pg2 vs. 28j.pg2pg3	***	0,0003
7j.wt vs. 28j.pg3	***	0,0002	7j.pg3 vs. 28j.pg2	**	0,0017	14j.pg3 vs. 28j.wt	**	0,0046
7j.wt vs. 28j.pg2pg3	****	<0,0001	7j.pg3 vs. 28j.pg3	****	<0,0001	14j.pg3 vs. 28j.pg2	*	0,0162
7j.pg2 vs. 21wt	*	0,0453	7j.pg3 vs. 28j.pg2pg3	****	<0,0001	14j.pg3 vs. 28j.pg3	***	0,0004
7j.pg2 vs. 28j.wt	**	0,0011	7j.pg2pg3 vs. 21wt	*	0,0332	14j.pg3 vs. 28j.pg2pg3	****	<0,0001
7j.pg2 vs. 28j.pg2	**	0,0044	7j.pg2pg3 vs. 28j.pg2	**	0,003	14j.pg2pg3 vs. 28j.wt	*	0,0101
7j.pg2 vs. 28j.pg3	****	<0,0001	7j.pg2pg3 vs. 28j.pg3	****	<0,0001	14j.pg2pg3 vs. 28j.pg2	*	0,0332
7j.pg2 vs. 28j.pg2pg3	****	<0,0001	7j.pg2pg3 vs. 28j.pg2pg3	****	<0,0001	14j.pg2pg3 vs. 28j.pg3	***	0,0009
7j.pg3 vs. 21wt	*	0,0203	14j.wt vs. 28j.pg3	**	0,0061	14j.pg2pg3 vs. 28j.pg2pg3	****	<0,0001
7j.pg3 vs. 21j.pg2	*	0,0496	14j.wt vs. 28j.pg2pg3	***	0,0003	21j.pg2pg3 vs. 28j.pg2pg3	*	0,038
Arabinose								
7j.pg2 vs. 28j.pg3	*	0,0136	7j.pg2 vs. 28j.pg2pg3	*	0,0463	-	-	-
Rhamnose								
-	-	-	-	-	-	-	-	-

Dans le mutant *pppg2*, la concentration massique de glucose n'augmente pas au cours du temps. Le mutant *pppg3* montre une différence significative entre la condition J7 et la condition J28 (p value = 0,0145). Tandis que le double mutant *pppg2/pppg3* montre une augmentation significative entre les conditions J7 et J21 (p value = 0,0319) et J7 et J28 (p value = 0,0003). Aucune différence significative n'est mise en évidence entre le WT et les mutants aux jours correspondants J7, J14, J21 et J28.

Le galactose est un sucre présent dans les ramifications de domaines pectiques RG-I, ainsi que dans de nombreuses hémicelluloses, bien que certaines enzymes responsables de la galactosylation d'hémicelluloses connus chez les plantes à graines ne soient pas retrouvées chez la bryophyte *Physcomitrium patens* (Zhong et al., 2019). Les mesures de concentrations massiques de galactose, présentées en **figure 43 C**, par ailleurs les plus élevées de tous les sucres mesurés, varient selon le stade de développement et le génotype, entre 1,56 g/100g DCW et 3,64 g/100gDCW. Le mutant *pppg2* présente un taux de galactose moins important que les autres génotypes à J7 et J28. Le test statistique Two-way ANOVA montre que deux différences significatives, entre *pppg2* à J7 et d'une part *pppg2* à J21 (p value = 0,0355) et d'autre part *pppg3* à J28 (p value = 0,0297).

L'arabinose, qui entre dans la composition des arabinoglucanes, mais également dans les ramifications des domaines pectiques RG-I et RG-II, est présenté en **figure 43 D**. Entre les différents temps de développement et les génotypes, ses concentrations massiques varient entre 0,62 g/100g DCW et 1,49 g/100g DCW. Le mutant *pppg2* présente là encore un taux d'arabinose moins important que les autres génotypes à J7 et J28. Le test statistique Two-way ANOVA montre par ailleurs que les seules différences significatives sont entre les mutants *pppg2* à J7 et *pppg3* à J28 (p value = 0,0136), ainsi qu'entre *pppg2* à J7 et *pppg2/pppg3* à J28 (p value = 0,0463). Par ailleurs, la tendance dans la variation de concentration massique d'arabinose, à la baisse chez les mutants *pppg2* à J7 et J28, semble suivre les mêmes tendances observées précédemment dans les mesures de concentrations massiques de galactose, c'est-à-dire une augmentation globale chez tous les génotypes, excepté chez *pppg2* à J7 et J28, dans la **figure 43 C**.

De la même manière, la quantité de mannose, composant des hémicelluloses, varie entre 0,15 et 0,81 g/100 gDCW **(figure 43 E)**. Une tendance à l'augmentation de la concentration massique de mannose au cours du temps, chez tous les génotypes, est là aussi observée. Le test statistique Two-way ANOVA indique des différences significatives pour le sauvage entre les stades de développement J7 et J21 (p value < 0,0001), J7 et J28 (p value < 0,0001), J14 et J21 (p value = 0,002) et J14 et J28 (p value < 0,0001). Pour le mutant *pppg2*, des différences significatives sont observées entre les stades J7 et J14 (p value = 0,0478), J7 et J21 (p value < 0,0001), J7 et J28 (p value < 0,0001) et J14 et J28 (p value = 0,0004). De même pour le mutant *pppg3* où des différences significatives sont mises en évidence entre les stades J7 et J21 (p value = 0,0004), J7 et J28 (p value < 0,0001), J14 et J28 (p value < 0,0001) et J21 et J28 (p value < 0,0001). Enfin, pour le double mutant *pppg2/pppg3*, des différences significatives ont été calculées entre les stades J7 et J14 (p value = 0,0016), J7 et J28 (p value < 0,0001), J14 et J28 (p value < 0,0001) et J21 et J28 (p value < 0,0001). Enfin, concernant les mutants en comparaison au sauvage, seule la différence entre WT et *pppg2/pppg3* à J28 est significative (p value = 0,0206).

La concentration massique du rhamnose, composant des rhamnogalacturonanes de type I (RG-I) et de type 2 (RG-II), présentée en **figure 43 F**, varie entre 0,23 et 0,35 g /100g DCW. Cependant, aucune différence significative n'a été calculée entre les différents stades de développement et les génotypes.

Enfin, la quantité de xylose, composant des xylogalacturonanes (XG), de certaines ramifications de RG-II mais également d'hémicelluloses de type xylanes et xyloglucanes, varie entre 0,64 et 1,11 g /100g DCW **(figure 43 G)**. Une tendance à l'augmentation de la concentration massique de xylose au cours du temps est observée chez tous les génotypes. Après analyses statistiques par test Two-way ANOVA, le génotype sauvage WT montre des différences significatives entre les stades J7 et J28 (p value = 0,0021). Le mutant *pppg2* montre des différences significatives entre les stades J7 et J28 (p value = 0,0044). Le mutant *pppg3* montre des différences significatives entre les stades J7 et J21 (p value = 0,0384), J7 et J28 (p value < 0,0001) et J14 et J28 (p value = 0,0004). Tandis que le double mutant *pppg2/pppg3* montre des différences significatives entre les stades J7 et J28 (p value < 0,00021), J14 et J28 (p value < 0,0001) et J21 et J28 (p value = 0,038). Cependant, pour chaque stade de développement, aucune différences significatives n'est observée entre les différents génotypes.

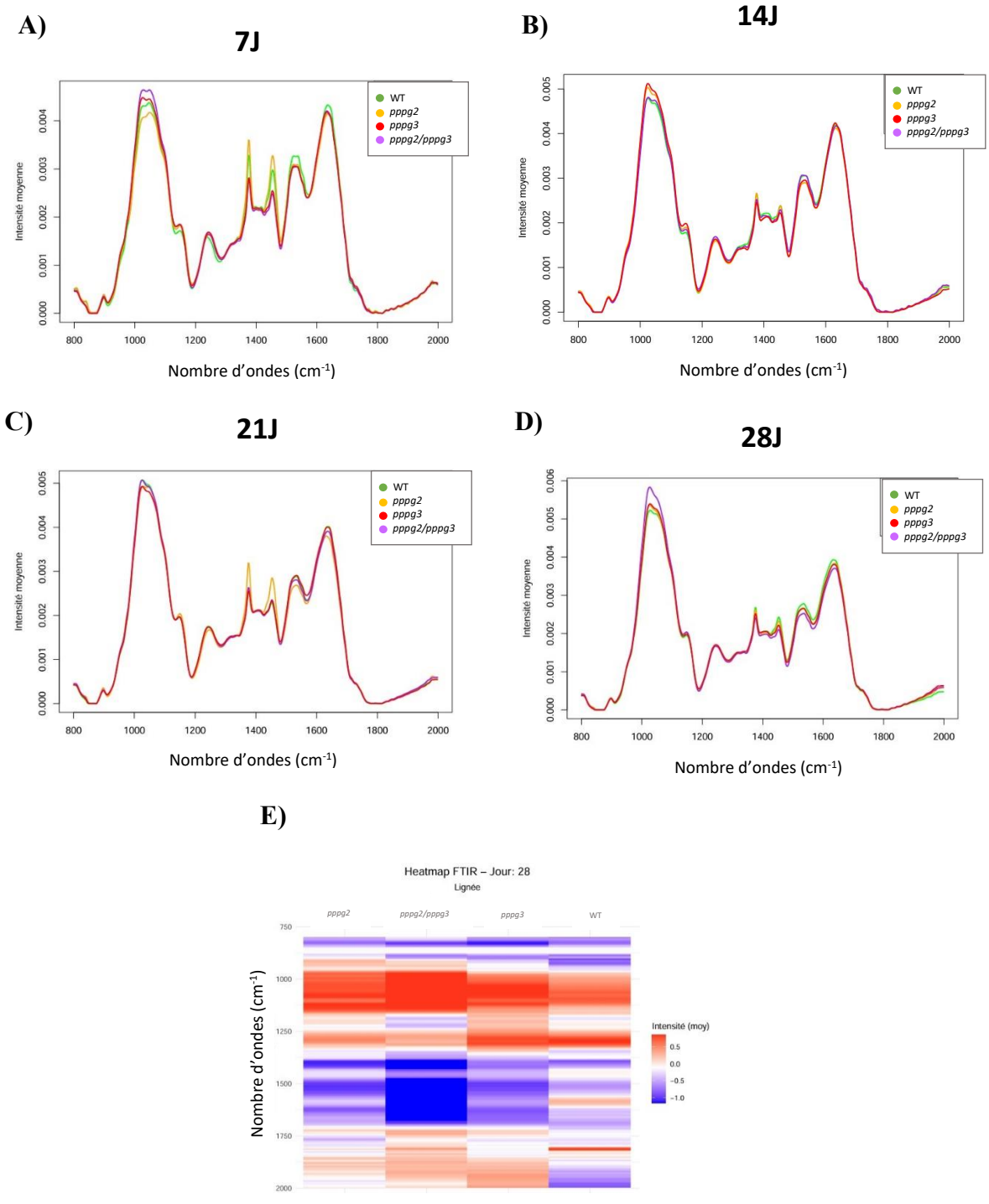


Figure 44 : Caractérisation de la paroi cellulaire des protonémas par FTIR au cours du temps.

Spectres des intensités moyennes d'absorbances de la matière sèche de paroi cellulaire de *Physcomitrium patens* sauvage (WT, vert), du mutant *pppg2* (orange), du mutant *pppg3* (rouge) et du double mutant *pppg2/pppg3*. A) 7 jours après repiquage (n=8). B) 14 jours après repiquage (n=8). C) 21 jours après repiquage (n=8). D) 28 jours après repiquage (n=8). E) Heatmap des absorbances de WT, *pppg2*, *pppg3* et *pppg2/pppg3* à 28 jours (n=8).

Toutes les différences significatives entre chaque génotype et chaque durée de développement, pour chacun des oses analysés, ont été regroupées dans le **Tableau 1**.

II.4.2.2. Détermination de la composition pariétale par détection des liaisons par FTIR

Afin de caractériser la composition pariétale des mutants *pppg2*, *pppg3* et *pppg2/pppg3*, et compléter les observations faites sur les sucres pariétaux, les polysaccharides pariétaux insolubles à l'alcool (AIR) ont été extraits de tissus des mutants à différents jours de croissance, 7, 14, 21 et 28, puis analysés par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR). Pour ces analyses, huit réplicats par temps de croissance et par génotype ont été moyennés (n=8).

Les échantillons âgés de 7 jours, présentés en **figure 44 A**, ont des pics d'absorbance plus élevées chez les mutants *pppg3* et *pppg2/pppg3*, par rapport au sauvage, lui-même plus élevé que le mutant *pppg2*, pour les nombres d'ondes compris entre 1000 et 1022 cm^{-1}, correspondant aux liaisons C-O-C et C-O des pectines HG (1020-1022) et RG-I et RG-II (1000-1015). Cependant, un pic légèrement plus important, entre 1600 à 1630 cm-1, correspondant aux liaisons -COOH des acides poly-galacturoniques, probablement des homogalacturonanes dé-estérifiés, identifiés notamment par leur groupement carboxyles, est observable dans le WT par rapports aux mutants. Le pic d'absorbance aux environs de 1400 cm^{-1} représente des fonctions carboxylate et peut donc correspondre aux HG non estérifiés. Il présente un niveau moins élevé d'absorbance chez les mutants *pppg3* et *pppg2/pppg3* par rapport au sauvage WT et au mutant *pppg2*. Il semble également y avoir plus d'hémicellulose, visibles aux pics à 1150cm^{-1} chez les trois mutants par rapport au WT. On remarque également des pics plus importants à 1370 cm^{-1}, représentant les xyloglucanes, et 1430 cm^{-1}, représentant la cellulose, chez le sauvage, et davantage chez le mutant *pppg2*.

Pour les échantillons âgés de 14 jours, présentés en **figure 44 B**, le pic situé entre 1000 et 1022 cm^{-1}, représentant des pectines, est plus élevé chez les simples mutants *pppg2* et *pppg3*. Là où le pic des carboxylates à 1400 cm^{-1} est plus élevé chez le sauvage. Le spectre présente également une légère augmentation du taux de cellulose, au pic situé à 1430 cm^{-1}, correspondant aux déformations CH_2, chez le WT par rapport aux mutants.

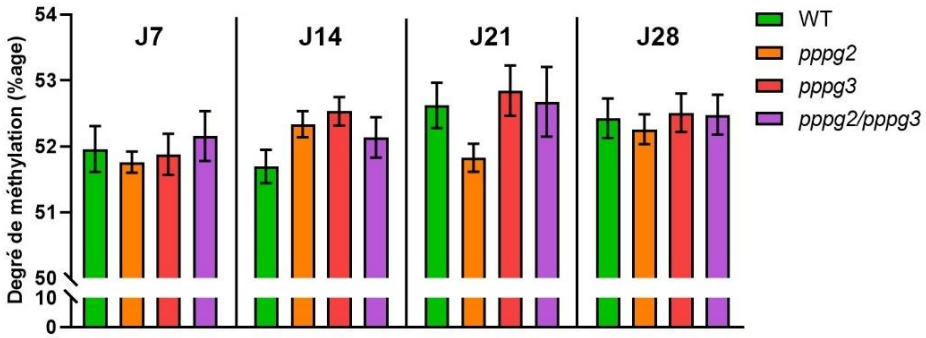


Figure 45 : Degré de méthylation (DM) des pectines de *Physcomitrium patens* des mutants *pppg2*, *pppg3*, *pppg2/pppg3*, aux jours 7, 14, 21 et 28 de développement (n=8).

Les échantillons âgés de 21 jours, présentés en **figure 44 C**, révèlent une légère baisse d'absorbance entre 1000 et 1022 cm^{-1}, correspondant aux liaisons glycosidiques C-O-C, chez les mutants *pppg2* et *pppg3* comparés au WT. Fait surprenant, pour le mutant *pppg2*, deux pics très distincts sont observés à 1370 cm^{-1} et 1430 cm^{-1}, représentant les xyloglucanes et la cellulose, respectivement. En revanche, les pics d'absorbance correspondant aux carboxylates COO^-, pouvant représenter une partie des acides poly-galacturoniques (entre 1600 et 1630 cm^{-1}) semblent moins importants chez les mutants *pppg2* et *pppg2/pppg3* que chez le WT.

Enfin, concernant les échantillons âgés de 28 jours, représentés en **figure 44 D**, une plus grande aire sous courbe de l'absorbance entre 1000 et 1022 cm^{-1}, correspondant aux pectines HG, RG-I et RG-II, chez les mutants *pg*, en particulier le double mutant *pppg2/pppg3* par rapport au génotype sauvage est observée. A l'inverse, l'absorption aux nombres d'ondes représentatifs des acides poly-galacturoniques et pectines dé-estérifiés (1600 à 1630 cm^{-1}) est moins importante chez les mutants par rapport au sauvage, de même que pour le pic représentatif des carboxylates (1400 cm^{-1}).

Sur la heatmap de la **figure 44 E**, sont présentées les valeurs d'absorbance des 4 échantillons de J28, par rapport à l'intensité moyenne des quatre échantillons. D'après cette représentation, le mutant *pppg2/pppg3* semble le plus différent dans sa composition pariétale. Il présente un minimum d'absorbance à 1600 cm^{-1}, et un maximum aux alentours de 1000 cm^{-1}.

Ces valeurs se détachent particulièrement de celles des trois autres génotypes. Le pic à 1600 cm^{-1}, représentant les pectines dé-estérifiées et carboxylates, est également remarquable par son intensité plus importante chez le sauvage en comparaison aux mutants.

Les données d'absorbances obtenues par la méthode FTIR permettent également de calculer le degré de méthylation (DM) des HG des échantillons analysés **(figure 45)** correspondant au pourcentage de résidus méthylés par rapport au total. Le DM est compris entre 50,55 % et 55,30 % pour les différentes conditions étudiées. Aucune tendance particulière ne semble se dessiner ni au cours du développement, ni entre les génotypes.

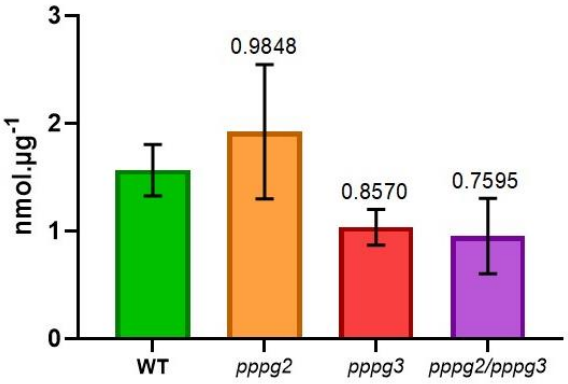


Figure 46 : Activité polygalacturonase totale des protéines extraites de matière fraîche de *Physcomitrium patens* à 28 jours de croissance de WT (vert), *pppg2* (orange), *pppg3* (rouge) et *pppg2/pppg3* (mauve) (n=6).

Les p value ont été obtenues après un test statistique One-way ANOVA en comparaison multiple.

II.4.3. Activité polygalacturonase des mutants

L'activité PG d'extraits enrichis en protéines pariétales a été dosée dans les différentes conditions testées (génotypes et points de cinétique de développement), afin d'évaluer les conséquences de la perte de fonction des gènes *PG* étudiés. Ainsi, le dosage d'activité polygalacturonase à partir d'une iso-quantité de protéines totales extraites des différents mutants est présentée **figure 46**. La moyenne des sucres réducteurs produits par l'action des polygalacturonases endogènes, est mesurée par µg de protéines totales et par minutes de réaction. Pour le génotype sauvage, 1,565 nmol.µg^{-1} de GalA a été produit, 1,923 nmol.µg^{-1} pour *pppg2*, 1,035 nmol.µg^{-1} pour *pppg3* et 0,953 nmol.µg^{-1} pour le double mutant *pppg2/pppg3*. Cependant, malgré des tendances suggérant une augmentation d'activité polygalacturonase chez *pppg2*, et une diminution d'activité chez *pppg3* et *pppg2/pppg3*, aucune différence significative n'est calculée avec un one-way ANOVA, vis-à-vis du WT, que ce soit *pppg2* (p value = 0,9848), *pppg3* (p value = 0,8570) ou *pppg2/pppg3* (p value = 0,7595).

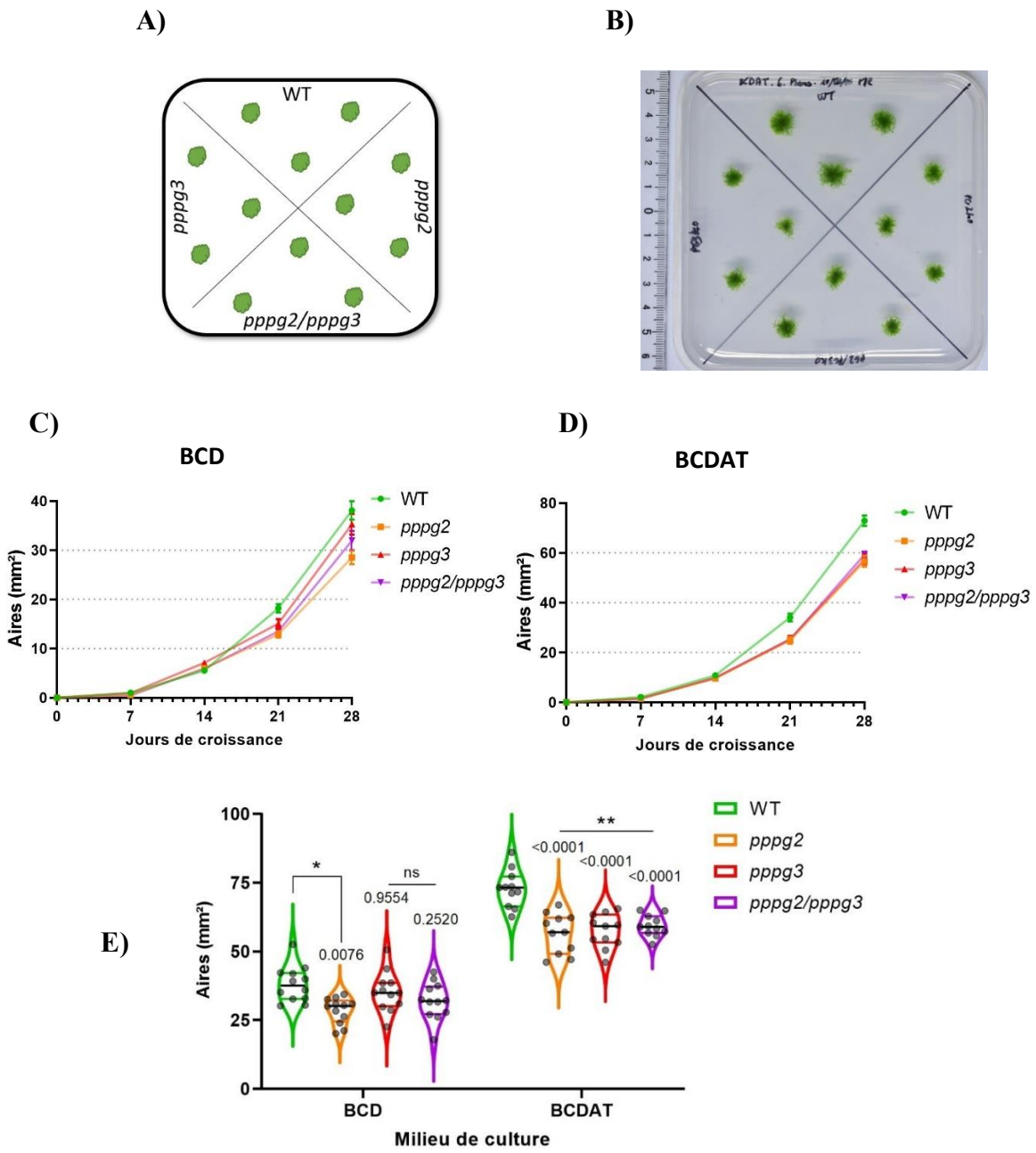


Figure 47 : Croissance bidimensionnelle des mutants *pppg2*, *pppg3* et *pppg2/pppg3* de *Physcomitrium patens* (n=12) sur les milieux de culture BCD et BCDAT, sur 28 jours de croissance.

A) Schéma du dispositif expérimental pour chaque boite de phénotypage, incluant 3 isolats pour chaque génotype. **B)** Photographie d'une boite de phénotypage sur milieu BCDAT à J+28. **C)** Aires des isolats des mutants et du sauvage *P. patens* à 7, 14, 21 et 28 jours de développement sur milieu BCD. **D)** Aires des isolats des mutants et du sauvage *P. patens* à 7, 14, 21 et 28 jours de développement sur milieu BCDAT. Un test statistique Two-way ANOVA montre des différences significatives entre le sauvage WT et *pppg2* sur BCD (*p value = 0,0076), puis entre le sauvage et *pppg2*, *pppg3* et *pppg2/pppg3* sur BCDAT (**p value < 0,0001). **E)** Moyennes des aires des isolats (n=12) de chaque génotype à J+28 sur milieux BCD et BCDAT.

II.4.4. Phénotypage des mutants *pppg2*, *pppg3* et *pppg2/pppg3*

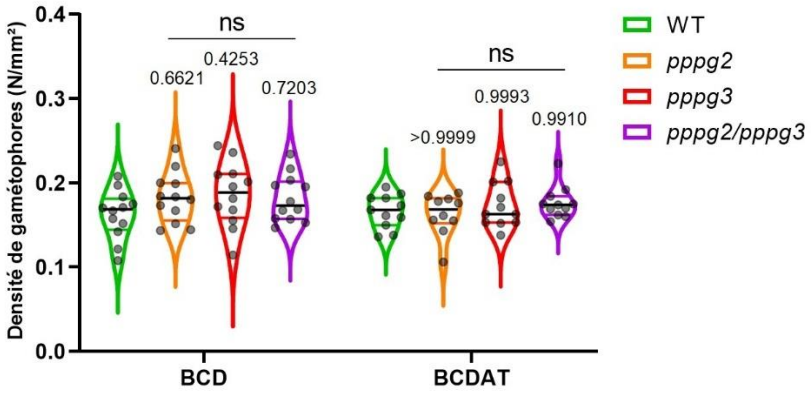
II.4.4.1. Phénotypage de la croissance bidimensionnelle des mutants

Afin d'évaluer l'impact des mutations sur la croissance bi-dimensionnelle de *Physcomitrium*, 36 isolats par génotypes ont été phénotypés au cours du temps, comme présenté en **figure 47 A**. Deux milieux de culture ont été testés : le milieu commun BCD, ainsi que le milieu BCDAT, supplémenté en ammonium tartrate, fournissant un apport supplémentaire en azote facilement assimilable, induisant le développement et la différenciation des protonémas vers la formation de gamétophores. Les aires sont mesurées à J0 (jour du repiquage), puis à J+7, J+14, J+21 et J+28 de croissance. La **figure 47 B** présente une photographie d'une boite à J+28, où les isolats sont tous bien développés et montre une différence observable entre les génotypes. Les aires moyennes à J0 sont soustraites aux aires mesurées des jours de croissances J+7, J+14, J+21 et J+28, et l'aire est exprimée en millimètre carré (mm^2).

Sur le milieu BCD, le sauvage (38,106 mm^2 en moyenne à J+28) présente une croissance plus importante que chacun des mutants (28,519 ; 35,294 et 31,945 mm^2 pour les mutants *pppg2*, *pppg3* et *pppg2/pppg3,* respectivement) **(figure 47 C)**. De plus, le mutant *pppg2* semble le plus affecté.

A noter qu'une aire plus grande que celle du sauvage est observée à J+14 chez le mutant *pppg3*, mais cela peut s'expliquer par la taille moyenne plus importante des isolats déposés à J0, provoquant une augmentation précoce de l'aire durant le développement des protonémas les premiers jours, mais compensé ensuite au fil du temps par les différences entre génotypes. Les analyses statistiques par test de Tukey, effectués sur les aires moyennes à J+28 comme présentés sur la **figure 47 E**, montrent des différences significatives entre l'aire moyenne du sauvage et du mutant *pppg2* (p value = 0,0076), mais pas entre le sauvage et les mutants *pppg3* (p value = 0,9554) et *pppg2/pppg3* (0,2520) à J+28.

A)



B)

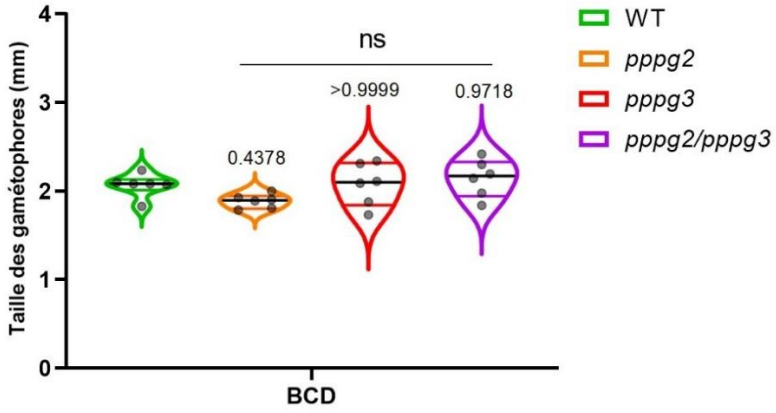


Figure 48 : Phénotypage de la croissance tridimensionnelle des mutants *pppg2*, *pppg3* et *pppg2/pppg3* et du sauvage à 28 jours de croissance.

A) Densité des gamétophores, calculée par le nombre de gamétophores par mm² d'aire, des mutants *pppg2*, *pppg3*, *pppg2/pppg3* et du sauvage de *P. patens* à 28 jours de développement sur les milieux BCD et BCDAT (n = 12). **B)** Longueur moyenne de gamétophores en millimètres (mm) des mutants *pppg2*, *pppg3*, *pppg2/pppg3* et du sauvage à 28 jours de croissance sur milieu BCD depuis 6 boîtes (n = 6). Les analyses statistiques ont été effectuées par test One-way ANOVA, les *p* values sont représentées au dessus de chaque génotype.

Sur le milieu BCDAT, les courbes de croissances moyennes des isolats des différents génotypes montrent en premier lieu une croissance bidimensionnelle plus importante de tous les génotypes comparés au milieu BCD **(figure 47 D et C)**. A J+28, les aires moyennes sont de 72,867 ; 56,609 ; 57,365 et 59,306 mm² pour le sauvage, *pppg2*, *pppg3* et *pppg2/pppg3* respectivement. Bien que cette augmentation de croissance s'opère sur tous les génotypes, elle n'est pas égale. A J+28, la croissance de WT est 1,91 supérieure sur BCDAT que sur BCD, contre 1,98 ; 1,62 et 1,85 fois supérieure pour les mutants *pppg2*, *pppg3* et *pppg2/pppg3* respectivement. La seconde observation est l'écart significatif entre l'aire moyenne des sauvages et des mutants *pg* sur le milieu BCDAT par rapport au milieu BCD. Cela est dû à une vitesse de croissance plus importante sur le milieu supplémenté en ammonium tartrate. Enfin, les analyses statistiques de Tukey montrent des différences très significatives à J+28 entre la taille du sauvage et celle des mutants *pppg2*, *pppg3* et *pppg2/pppg3* (p value < 0,0001). Mais aucune différence significative entre les mutants n'a été observée.

II.4.4.2. Phénotypage de la croissance tridimensionnelle des mutants

Le phénotypage des gamétophores est effectué en comptant le nombre de gamétophores sur chacun des isolats de tous les génotypes (n = 12), pour chaque milieu, BCD ou BCDAT, et en le rapportant aux aires respectives **(figure 48 A)**. Ainsi, à J+28, la densité moyenne de gamétophores varie entre 0,107 et 0,244 gamétophores par mm² sur milieu BCD et entre 0,106 et 0,225 gamétophores par mm² sur milieu BCDAT, sans différence statistique entre génotypes ou milieux.

La longueur des gamétophores a été également été mesurée pour plusieurs isolats de chaque génotype sur milieu BCD (n=6) **(figure 48 B)**. La taille moyenne des gamétophores à J+28 varie entre 1,73 mm et 2,41 mm selon les génotypes, sans différence significative entre génotypes ou milieux.

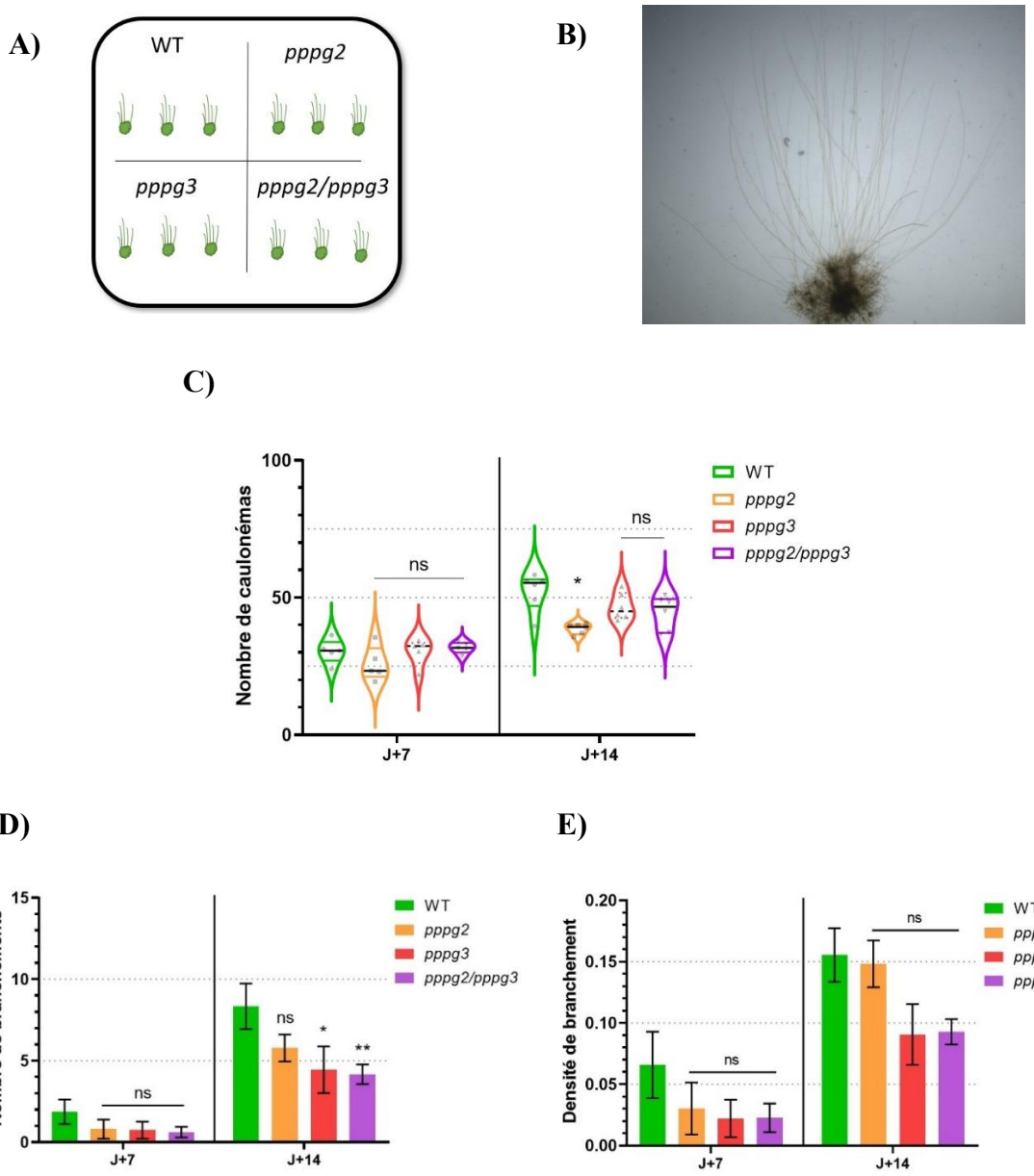


Figure 49 : Phénotypage des caulonémas agravitropiques des mutants *pppg2*, *pppg3* et *pppg2/pppg3* et du sauvage sur milieu BCD, après 7 et 14 jours de croissance à l'obscurité.

A) Schéma du dispositif expérimental pour chaque boite de phénotypage de caulonémas agravitropiques, incluant 3 isolats pour chaque génotype (n=6). **B)** Photographie de phénotypage des caulonémas agravitropiques d'un isolat sur milieu BCD après 14 jours de croissance à l'obscurité (J+14). **C)** Nombre moyen de caulonémas agravitropiques mesuré chez les mutants *pppg2*, *pppg3*, *pppg2/pppg3* et le sauvage à J+7 et J+14. Un test Two-way ANOVA montre une différence statistique entre le sauvage WT et *pppg2* (*p value = 0,0002). **D)** Nombre d'embranchement moyen par caulonémas mesuré chez les mutants *pppg2*, *pppg3*, *pppg2/pppg3* et le sauvage à J+7 et J+14. Un test Two-way ANOVA montre des différences statistiques entre le sauvage WT et *pppg3* (*p value = 0,02), et *pppg2/pppg3* (**p value = 0,0114), à 14 jours. **E)** Densité d'embranchement mesurée, soit le nombre d'embranchements moyen par caulonémas, chez les mutants *pppg2*, *pppg3*, *pppg2/pppg3* et le sauvage à J+7 et J+14.

II.4.4.3. Phénotypage des caulonémas agravitropiques des mutants

Afin d'étudier la fonction des gènes *PpPG2* et *PpPG3* et donc l'effet de ces protéines sur le développement des caulonémas, les mutants ont été mis en culture à l'obscurité pour observer et comparer les caulonémas agravitropiques. Le phénotypage des caulonémas agravitropiques a été réalisé sur des isolats de tissus protonémaux des 4 génotypes étudiés, jusqu'à 14 jours de croissance, car la croissance des caulonémas induits est plus rapide que les protonémas à la lumière. L'expérience a été réalisée selon le dispositif expérimental présenté **figure 49 A**. Après 7 (J+7) et 14 (J+14) jours de de croissance à l'obscurité, des photographies ont été prises et les dénombrements réalisés, comme par exemple à J+14 sur la **figure 49 B**.

Le nombre moyen de caulonémas dénombrés sur les différents isolats à J+7 est de 31,73 pour le sauvage, de 25,77 pour *pppg2*, 30,33 pour *pppg3* et 31,73 pour le double mutant ko *pppg2/pppg3* **(figure 49 C)**. A J+14, les moyennes sont de 52,33 pour le sauvage, 38,67 pour *pppg2*, 46,61 pour *pppg3* et 44,56 pour *pppg2/pppg3*. Les tests statistiques en Two-way ANOVA et comparaison multiple de Tukey montrent une différence significative entre les conditions J+7 et J+14, pour tous les génotypes, donc pour le sauvage (p value < 0,0001), pour *pppg2* (p value = 0,0006), pour *pppg3* (p value < 0,0001) et *pppg2/pppg3* (p value = 0,0006). Cependant, à J+14, on observe significativement moins de caulonemas chez le mutant *pppg2* par rapport au sauvage (p value = 0,0002). Le nombre de divisions dans les caulonémas, (évalué par le nombre de branchements par caulonema), a aussi été mesuré et présenté en **figure 49 D**. A J+7 de croissance, le nombre moyen de branchements pour le génotype sauvage est de 1,87 contre 0,80, 0,73 et 0,73 pour les mutants *pppg2*, *pppg3* et *pppg2/pppg3* respectivement, tandis qu'à J+14, les moyennes montent à 8,33 pour le sauvage, contre 5,78 ; 4,44 et 4,17 pour les mutants *pppg2*, *pppg3* et *pppg2/pppg3* respectivement. Il semble donc que les mutants présentent moins de branchement que le sauvage. Le test statistique Two-way ANOVA montre une différence entre les conditions J+7 et J+14 de croissance chez le sauvage (p value < 0,0001) et les mutants *pppg2* (p value = 0,0024), *pppg3* (p value = 0,0325) et *pppg2/pppg3* (p value = 0,0314). De plus, à J+14, une différence significative est calculée entre le sauvage et le mutant *pppg3* ko (p value = 0,02), ainsi qu'avec le mutant *pppg2/pppg3* (p value = 0,0114).

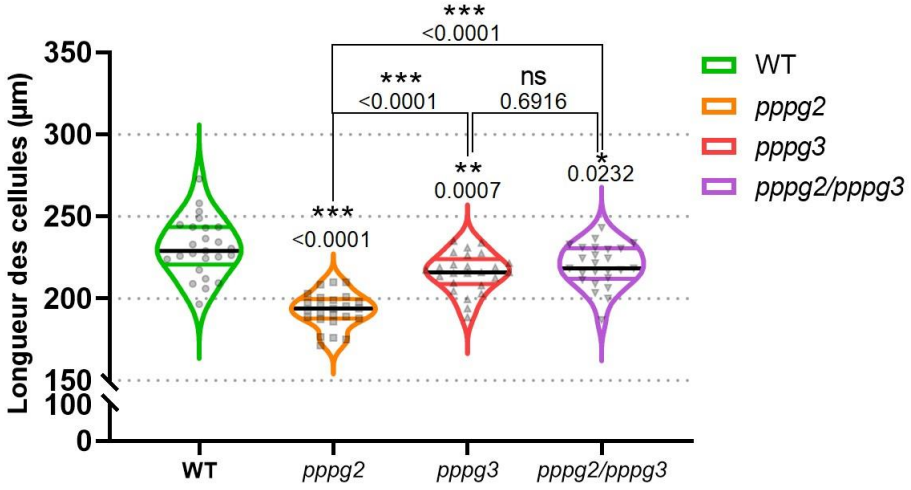


Figure 50 : Tailles moyennes des 25 premières cellules des caulonémas agravitropiques du sauvage et des mutants *pppg2*, *pppg3* et *pppg2/pppg3* de *Physcomitrium patens* sur milieu BCD après 14 jours de croissance à l'obscurité.

Un test statistique One-way ANOVA montre des différences significatives entre le sauvage WT et *pppg2* (***p value < 0,0001), *pppg3* (**p value = 0,0007) et *pppg2/pppg3* (*p value = 0,0232). Ainsi qu'entre *pppg2* et *pppg3* (***p value < 0,0001) et *pppg2/pppg3* (***p value < 0,0001).

Enfin, les densités de branchement sont présentées en **figure 49 E** (nombre de branchements rapporté au nombre de caulonemas). A J+7 la densité est de 0,07 branche par caulonéma pour le sauvage, contre 0,03 ; 0,02 et 0,02 chez les mutants *pppg2* ; *pppg3* et *pppg2/pppg3,* respectivement. Tandis qu'à J+14, la densité moyenne est de 0,16 branche par caulonéma pour le sauvage, contre 0,15 ; 0,09 et 0,09 chez les mutants *pppg2* ; *pppg3* et *pppg2/pppg3* respectivement. L'analyse statistique par Two-way ANOVA montre une augmentation significative de la densité de branchement chez le sauvage entre J+7 et J+14 (p value = 0,0119) ainsi que chez le mutant *pppg2* (p value = 0.0007), mais pas chez les autres mutants. Malgré une tendance visible, aucune différence significative n'est calculée entre les différents génotypes, aussi bien à J+7 qu'à J+14.

Pour continuer le phénotypage des mutants *pppg2*, *pppg3* et *pppg2/pppg3*, les cellules des caulonémas ont été observées au macroscope. Des mesures de taille ont été effectuées sur les 25 premières cellules par génotypes à partir de deux boites différentes après 14 jours de croissance à l'obscurité. Les moyennes des tailles de ces cellules, de la première à la 25ème cellule, sont présentées **figure 50**. Chez le sauvage, la taille d'une cellule de caulonéma varie entre 196 µm et 258 µm pour le sauvage tandis qu'elle est comprise entre 175 µm et 210 µm chez le mutant *pppg2*, entre 194 µm et 235 µm chez le mutant *pppg3*, et entre 187 µm et 243 µm chez le double mutant *pppg2/pppg3*. Les tests statistiques de Tukey présentent des différences significatives entre WT et *pppg2* (p value < 0,0001), entre WT et *pppg3* (p value = 0,0007) et entre WT et *pppg2/pppg3* (p value = 0,0232) : la perte de fonction de PpPG2 et/ou PpPG3 empêche l'allongement cellulaire. Des différences significatives ont aussi été calculées entre *pppg2* et *pppg3* (p value < 0,0001) ainsi qu'entre *pppg2* et *pppg2/pppg3* (p value < 0,0001).

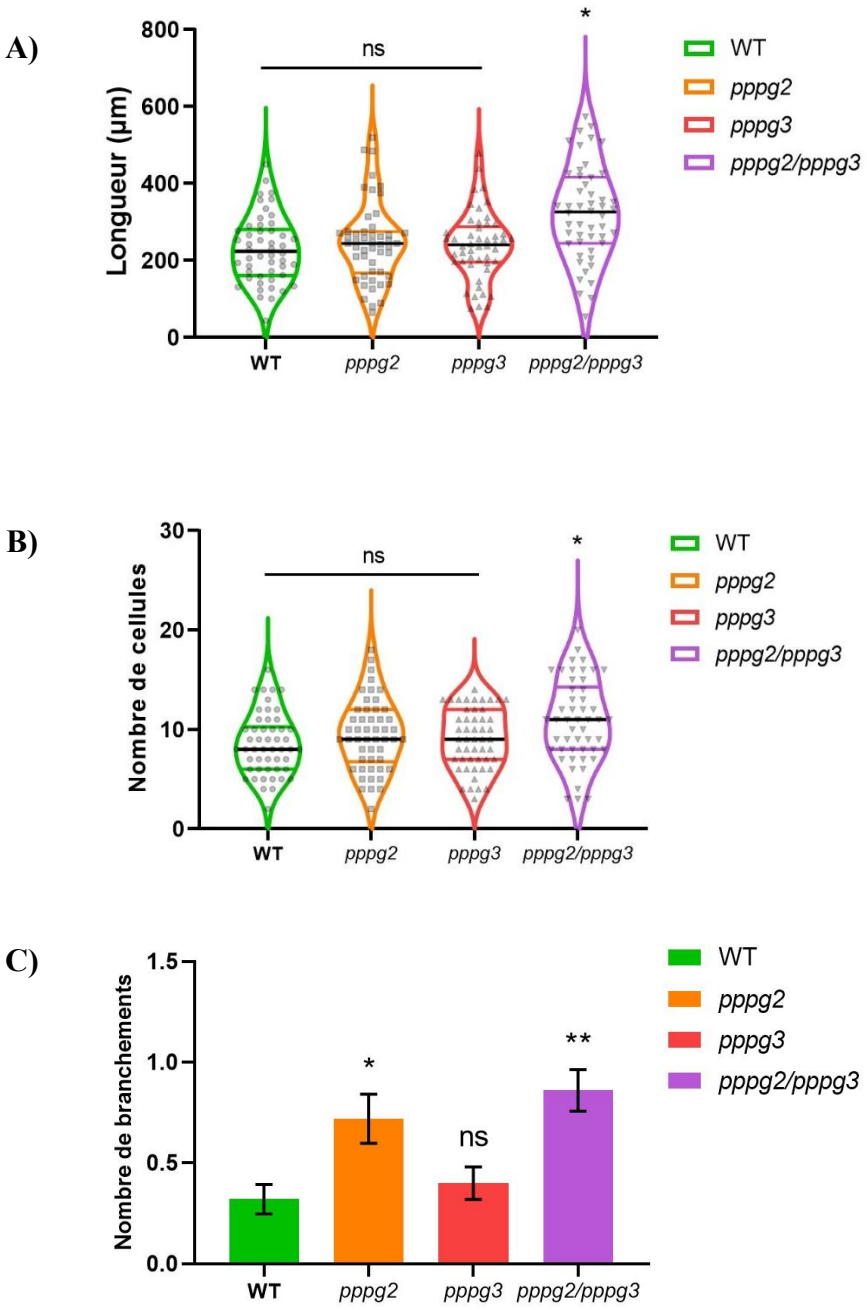


Figure 51 : Phénotypage des protoplastes régénérant des mutants *pppg2*, *pppg3* et *pppg2/pppg3* et du sauvage après 7 jours de croissance dans le milieu PRM.

A) Longueur des régénérants (n=50). Un test One-way ANOVA montre une différence statistique entre le sauvage WT et *pppg2/pppg3* (*p value < 0,0001). **B)** Nombre de cellules composant chacun des régénérants (n=50). Un test One-way ANOVA montre une différence statistique entre WT et *pppg2/pppg3* (*p value = 0,0063). **C)** Nombre moyen de branchements par régénérant (n=50). Un test One-way ANOVA montre des différences significatives entre WT et *pppg2* (*p value = 0,0194), et *pppg2/pppg3* (**p value = 0,0006).

II.4.4.4. Production de protoplastes et phénotypages des régénérants des mutants

Des protoplastes ont été produits pour étudier les différences morphologiques des mutants au niveau des premières cellules de protonémas, notamment chloronémas (divisions, élongation). Au bout de 7 jours de régénération, les protoplastes ont été photographiés et mesurés. Les longueurs de 50 protoplastes regénérants par génotypes ont été mesurées et sont présentées **figure 51 A**. Pour le sauvage, les longueurs mesurées varient entre 44 µm et 449 µm. Elles sont comprises entre 80 µm et 484 µm pour le mutant *pppg2*, entre 105 µm et 478 µm pour le mutant *pppg3*, et entre 103 µm et 573 µm pour le double mutant *pppg2/pppg3*. Les analyses statistiques de comparaison multiple de Tukey montrent une longueur moyenne des régénérant *pppg2/pppg3* significativement plus importante que le WT (p value < 0,0001), mais également que les mutants *pppg2* (p value = 0,0012) et *pppg3* (p value = 0,0003).

Les cellules de chacun des 50 régénérants par génotype a également été dénombrées et les résultats sont présentés dans la **figure 51 B**. Pour le sauvage, il a été compté entre 2 et 16 cellules par régénérant, entre 2 et 18 pour le mutant *pppg2*, entre 3 et 14 pour le mutant *pppg3* et entre 3 et 20 pour le double mutant *pppg2/pppg3*. D'après le test de Tukey, seul le double mutant *pppg2/pppg3* présente significativement plus de cellules que le sauvage (p value = 0,0063).

Enfin, pour compléter le phénotypage des premières cellules de protonémas, le nombre de branchements a été mesuré pour chacun des 50 régénérants par génotype **(figure 51 C)**. La moyenne du nombre de branches secondaires sur les 50 régénérants par génotype est de 0,32 pour le sauvage, contre 0,82 ; 0,44 et 0,73 pour les mutants *pppg2*, *pppg3* et *pppg2/pppg3* respectivement. Les analyses statistiques de Tukey révèlent des différences significatives entre le WT et le mutant *pppg2* (p value = 0,0194) ainsi qu'entre le WT le double mutant *pppg2/pppg3* (p value = 0,0006), mais également entre les mutants *pppg3* et *pppg2/pppg3* (p value = 0,0049).

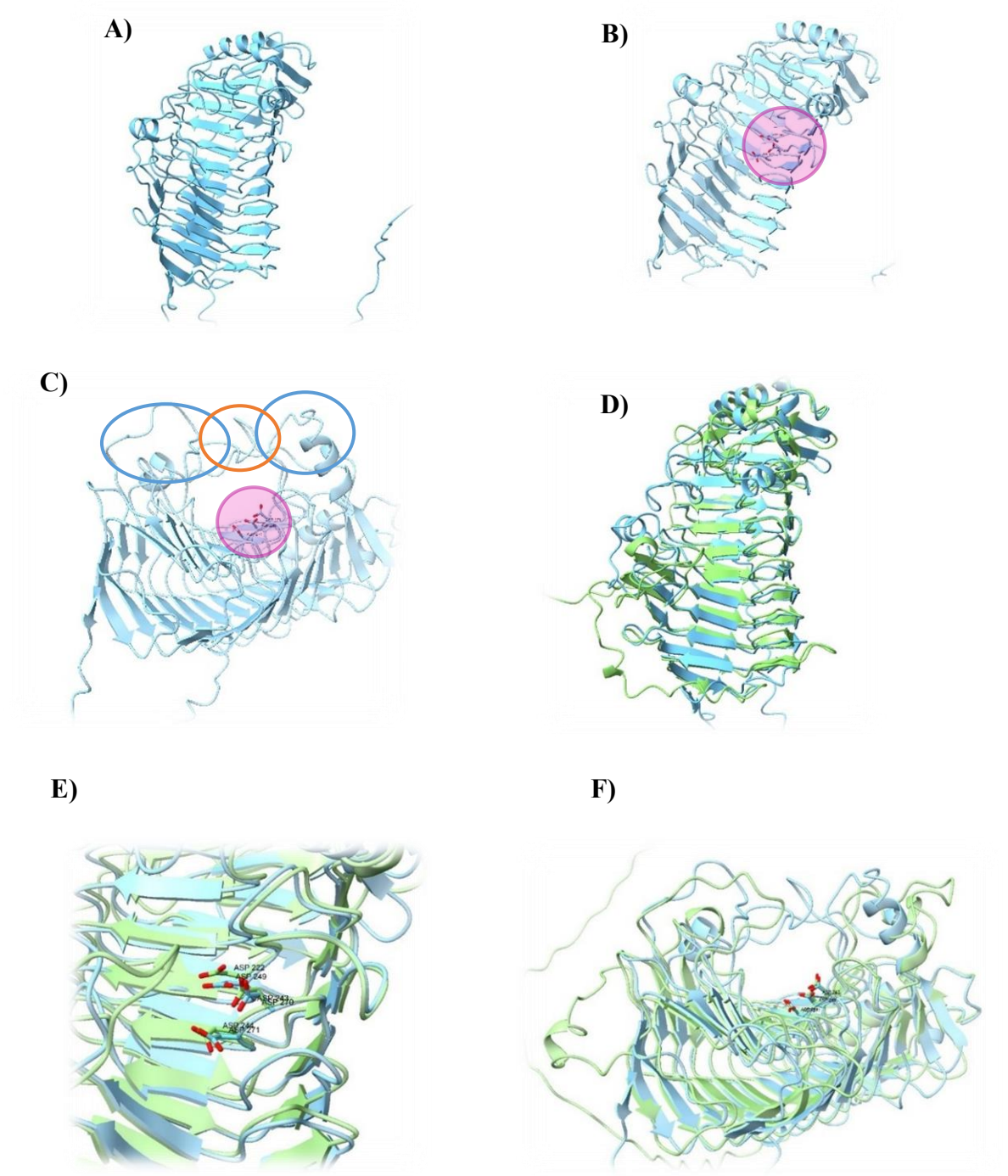


Figure 52 : Représentations tridimensionnelles en ruban des alignements de structures de PpPG4 et PGLR.

A) Vue de face du modèle de structure de PpPG4. **B)** Emplacement du site actif de PpPG4 (cercle violet) en vue de face. **C)** Emplacement du site actif de PpPG4 en vue de dessous (cercle violet). Les cercles bleus montrent les deux boucles présentes de part et d'autre du sillon du tonneau β tandis que le cercle orange montre la troisième boucle localisée au-dessus. **D)** Vue de face de l'alignement structural entre PpPG4 (bleu) et PGLR (vert). **E)** Comparaison de la triade d'acides Aspartiques des sites actifs de PpPG4 et PGLR. **F)** Vue de dessous de la localisation des sites actifs de PpPG4 et PGLR.

CHAPITRE III : LA POLYGALACTURONASE PpPG4

III.1. Etudes bio-informatiques de PpPG4

Une autre partie du travail de thèse était d'étudier une autre protéine, PpPG4 (Pp3c23_13240). Cette protéine a été sélectionnée sur la base des données d'expression des PGs de *Physcomitrium patens* qui montrent qu'il s'agit du gène *PG* le plus fortement exprimé dans de nombreux organes lors du développement de la plante, notamment dans les chloronémas, les caulonémas et les gamétophores **(figure 36 A)**. Comme pour les protéines PpPG2 et PpPG3, un modèle de structure tridimensionnelle a été prédit en utilisant Alphafold, puis a été analysé grâce à Chimera X. La structure de PpPG4, sur laquelle on retrouve un tonneau de feuillets β, est présentée de face sur la **figure 52 A**. La triade d'acides aspartiques, correspondant au site actif typique des polygalacturonases, a été retrouvée et est présentée dans le cercle violet sur les **figures 52 B** et **52 C**. On remarque également 3 boucles entourant le tonneau βoù est situé le site actif (en vert et orange), dont celle semblable à celle observée sur PpPG2 (orange), qui est caractéristique des exo-PGs. La structure de PpPG4, présentée en bleu, est comparée avec celle de PGLR, présentée en vert **figure 52 D**. Les acides aspartiques formant le site actif de PpPG4 sont localisés à la même position que ceux de PGLR. Les triades catalytiques de ces deux protéines, Asp 249, Asp 270 et Asp 271 sur PpPG4 et Asp 222, Asp 243 et Asp 244 sur PGLR, sont alignées et présentées vues de face sur la **figure 52 E**, et vues de dessous sur la **figure 52 F**.

Les analyses comparatives entre les structures de PpPG4 et PGLR sur Chimera X indiquent un score d'alignement de 565,5, donc supérieur aux alignements de PGLR et PpPG2 ainsi que de PGLR et PpPG3. En revanche, 276/402 paires d'acides aminés forment un noyau conservé de 0,902 Å de RMSD, pour un RMSD global de 26,784 Å. Ce qui signifie que PpPG4 et PGLR présentent une bonne conservation mais de très grosses différences en périphérie du noyau conservé.

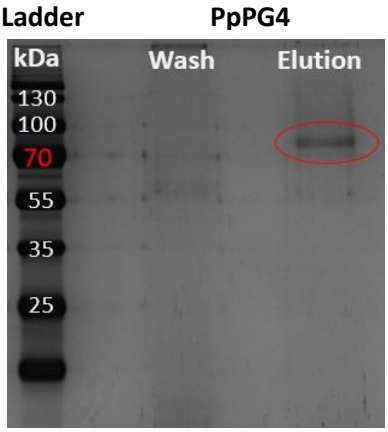


Figure 53 : SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie des différentes fractions de purification de PpPG4 : Wash et Elution qui contient la fraction purifiée de la protéine.

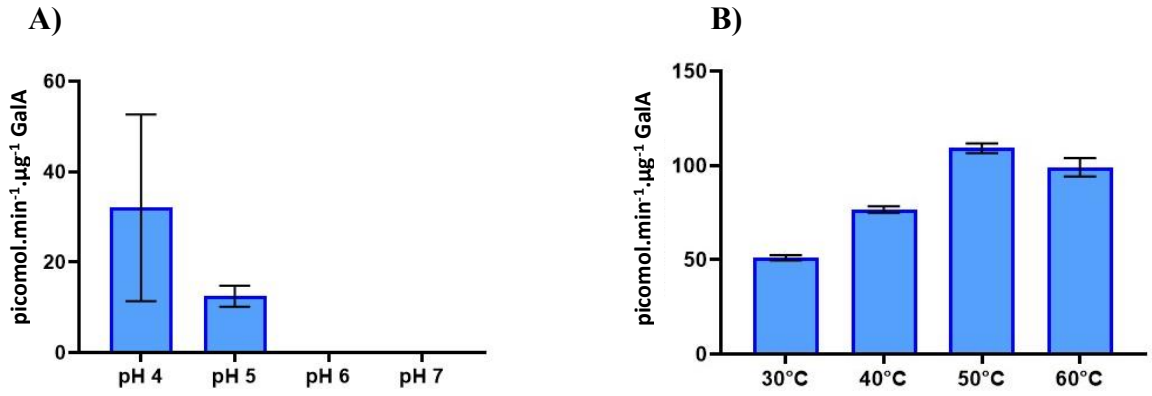


Figure 54 : Résultats des tests d'activité optimum de PpPG4.

A) Activité de PpPG4 sur du PGA 1% à différents pH, pendant 240 minutes à 40°C. **B)** Test d'activité de PpPG4 en fonction de la température sur du PGA 1%, à pH4 pendant 240 minutes.

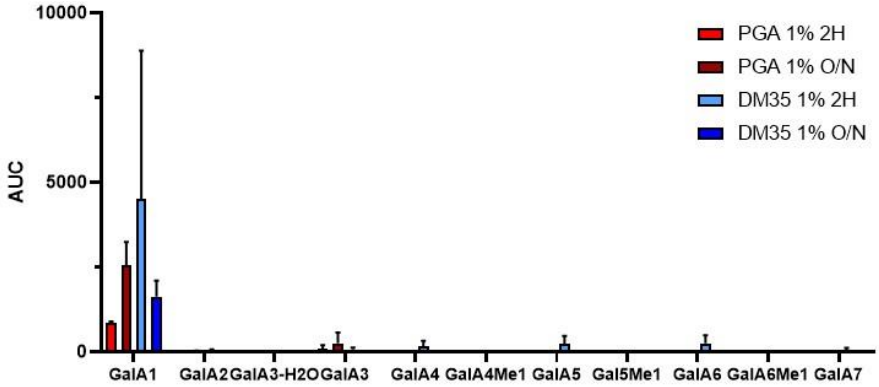


Figure 55 : OGs libérés (en AUC, Area under curve) par l'action de PpPG4 sur PGA 1% (rouge) et DM35 1% (bleu), pendant 2 heures de digestion (2H, clair) et overnight (O/N, foncé).

III.2. Caractérisation biochimique de PpPG4

III.2.1. Production et purification

La protéine PpPG4 a été produite par le système hétérologue *Pichia pastoris*, grâce au vecteur pPICZα. Ce système permet de produire un rendement important de protéines hétérologues. De plus, *Pichia pastoris* étant un organisme eucaryote, il permet également des modifications post-traductionnelles. De plus, cette levure permet une sécrétion facilitée, ce qui favorise la production de protéines dans le surnageant, ce qui facilite la purification ultérieure. Différentes fractions récoltées durant la purification sont présentées dans la **figure 53**. La protéine purifiée est identifiée sur le SDS-PAGE à environ 90 kDa. La taille attendue est de 52,5 kDa (50,5 kDa + 2 kDa pour 6xHis et c-myc, mais NetNglyc 1.0 prédit 6 sites de N-glycosylation. La présence de glycosylations sur la protéine produite pourrait expliquer le poids moléculaire plus élevé observé après migration sur gel.

III.2.2. Activité polygalacturonase

L'activité polygalacturonase de PpPG4 a été mesurée en utilisant le PGA comme substrat. Les conditions enzymatiques optimales ont également été caractérisées. Un premier test de recherche de pH optimal d'activité, présenté en **figure 54 A**, a été effectué sur du PGA 1% à 40°C pendant 240 minutes de digestion pour 4 pH (4, 5, 6 et 7). Le maximum d'activité est mesuré à pH 4, avec 32,03 picomoles.μg^{-1}.min^{-1} de PpPG4. Ce pH optimal pour l'activité de PpPG4, a été utilisé pour déterminer la température optimale d'activité de PpPG4 **(figure 54 B)**. Ainsi, un pic d'activité a été observé à 50°C, avec une moyenne de 51,16 picomoles de Gal-A produits par µg de PpPG4 par minutes de digestion.

III.2.3. Caractérisation du mode d'action par oligoprofilage

La caractérisation de PpPG4 s'est poursuivie afin de déterminer son mode d'action, endo- ou exo-polygalacturonase, par identification des oligogalacturonides produits après hydrolyse. Comme pour PpPG2 et PpPG3, deux substrats ont été utilisés : le PGA et des HGs méthylestérifiées à 35%. (DM35). Chacun de ces substrats a été digéré soit deux heures, soit toute une nuit (overnight, O/N). Les résultats de l'oligoprofilage des produits de digestion de PpPG4 sont présentés dans la **figure 55**.

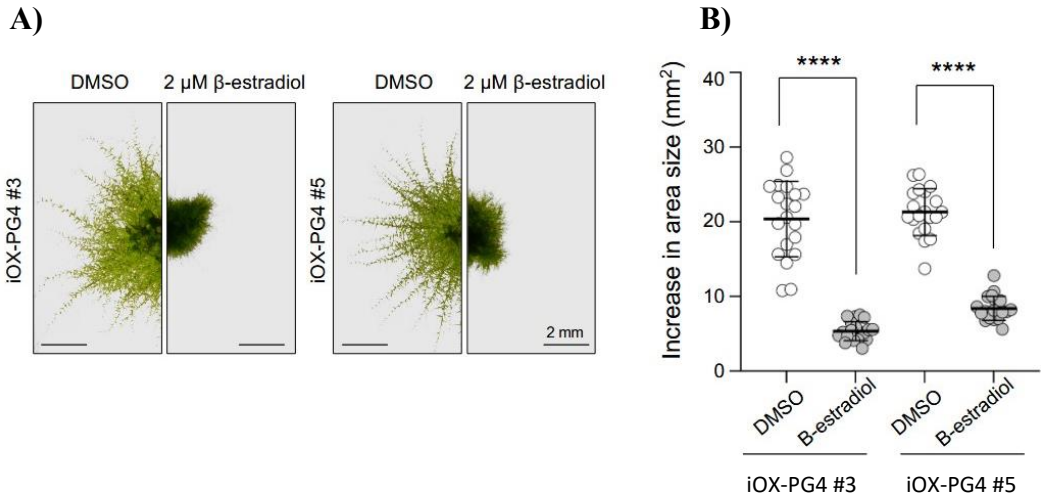


Figure 56 : Phénotypage des surexpresseurs inductibles PpPG4 (iOX-PG4), clones #3 et clone #5.

A) Photographies comparatives des clones #3 et #5 sans induction (DMSO) et avec induction (2 µM β-estradiol). **B)** Aires en mm² des clones #3 et #5 sans induction (DMSO) et avec induction (2 µM β-estradiol).

Pour les deux substrats et les deux temps de digestions, une majorité de GalA1 a été produite. Dans le cas du PGA, digéré pendant 2 heures, l'AUC moyenne des GalA1 est de 842,11, tandis que la digestion overnight montre une plus grande production de GalA1 avec un AUC moyenne de 2549,41. Enfin, concernant le DM35, la digestion de 2 heures montre un pic de GalA1 avec une AUC moyenne de 4515,43, contre seulement 1623,74 dans le cas de la digestion overnight. Les traces de hauts DPs doivent être des fragments résiduels constitutifs du substrat utilisé.

III.3. Mutants surexpresseurs inductibles et phénotypage de iOX-PG4

Afin d'étudier la fonction du gène *PpPG4* et donc les effets de cette protéine sur le développement et la morphologie de *Physcomitrium patens*, des mutants ont été générés et caractérisés. Une stratégie d'addition de gène et de promoteur inductible par recombinaison homologue a été effectuée afin d'obtenir des mutants gain de fonction, pour le gène *PpPG4*, sous condition d'induction. Différents clones ont été obtenus par transformation de protoplastes, puis ont été sélectionnés. Les clones ont été phénotypés par comparaison de cultures sur milieux mock (DMSO) et ou induites (2µM β-estradiol). Les deux clones #3 et #5 ont été sélectionnés comme ayant un fort phénotype lors de l'induction.

Le phénotypage des deux lignées surexpresseurs de *PpPG4* sont présentés en photographies, sur milieu non inductible, mock (DMSO), servant de contrôle négatif, et sur milieu inductible (2µM β-estradiol) sur la **figure 56 A**. Une forte diminution du développement du tissu protonémal est observé après induction des 2 lignées iOX-PG4. Ceci se confirme avec les mesures d'aires de ces clones, dont les résultats sont présentés sur la **figure 56 B**. Aux mêmes temps de développement, une nette différence est observée entre les aires sous induction, donc dans le cas de la surexpression de *PpPG4*, beaucoup moins grandes que les aires sur milieu dépourvu de β-estradiol. Ces résultats préliminaires demandent à être complétés afin d'évaluer de manière formelle le rôle de PpPG4 dans le développement de *Physcomitrium patens*.

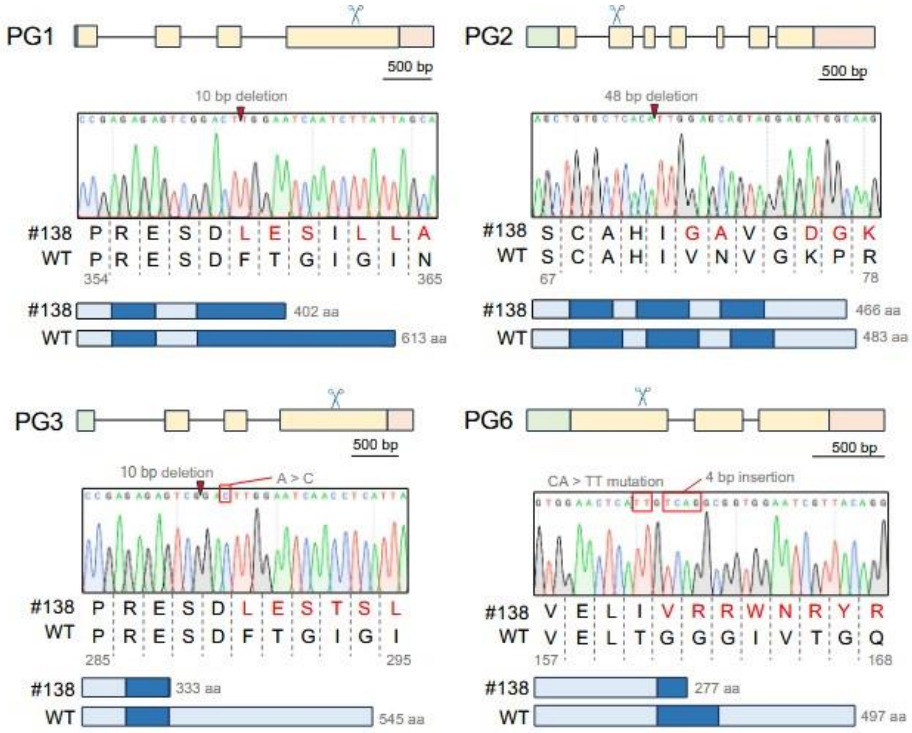


Figure 57 : Génotypage des mutations induites par CRISPR dans les gènes PpPG1 (PG1), PpPG2 (PG2), PpPG3 (PG3) et PpPG6 (PG6) dans le clone #138.

Les rectangles représentent les exons des gènes ciblés. Les ciseaux représentent les lieux où ont été détectés les délétions. Les barres bleues représentent les tailles des séquences aminoacides des protéines exprimées par les gènes mutés de #138, en comparaison aux protéines sauvages (WT).

CHAPITRE IV : MUTANTS MULTIPLEX PAR MÉTHODE CRISPR

IV.1. Obtention et génotypage de mutant CRISPR

Afin d'obtenir des mutants multiples de gènes codant pour des PGs chez *Physcomitrium patens*, et donc pour étudier les effets de l'extinction de plusieurs de ces gènes et comprendre leurs fonctions combinées, une approche de transformation de *P. patens* par méthode CRISPR-Cas9 a été réalisée. Cette méthode permet de cibler plusieurs gènes simultanément. Suite à l'identification de tous les gènes codant pour le 13 gènes *PGs* putatifs chez *Physcomitrium patens*, des séquences d'ARN guides (gRNA) de 20 nucléotides pour chacun de ces gènes ont été modélisés à partir des séquences codantes de ces gènes. Plusieurs stratégies, donc plusieurs choix de gRNA, ont été étudiés. Le choix s'est porté sur le ciblage de 4 gènes codants pour les PGs PpPG1 (*Pp3c1_12100*), PpPG2 (*Pp3c9_14240*), PpPG3 (*Pp3c9_20390*) et PpPG6 (*Pp3c5_16250*).

Parmi les clones obtenus par transformation par la méthode CRISPR, le clone #138 présentait un phénotype fort après plusieurs repiquages, où le développement de ses protonémas était largement réduit par rapport au sauvage. Il a donc été sélectionné pour un génotypage par la méthode Sanger sur les 4 gènes PGs cibles de la transformation : *PpPG1*, *PpPG2*, *PpPG3* et *PpPG6*. Dans ce clone, le gène *PpPG1* a subi une délétion de 10 paires de bases (bp), provoquant la création d'un codon stop prématuré au 403ème AA (acide aminé), au lieu du 614ème chez le sauvage, privant la protéine qui sera exprimée d'une partie de son extrémité C-terminale. Le gène *PpPG2* a subi une délétion de 48 paires de bases dans le second exon, provoquant une perte de 16 AA mais restant dans le cadre de lecture. La protéine PpPG2 du mutant #138 ne fait que 466 AA au lieu de 483 AA pour le sauvage. Le gène *PpPG3* a subi une délétion de 10 paires de bases et 1 échange de paire de base, provoquant la création d'un codon stop prématuré au 334ème AA au lieu du 546ème chez le sauvage, privant la protéine d'une partie de son extrémité C-terminale. Enfin, le gène *PpPG6* a subi une insertion de 4 paires de bases, ainsi qu'un échange de 2 paires de bases, provoquant la création d'un codon stop immature au 278ème AA, au lieu du 498ème chez le sauvage, privant la protéine d'une partie de son extrémité C-terminale **(figure 57)**.

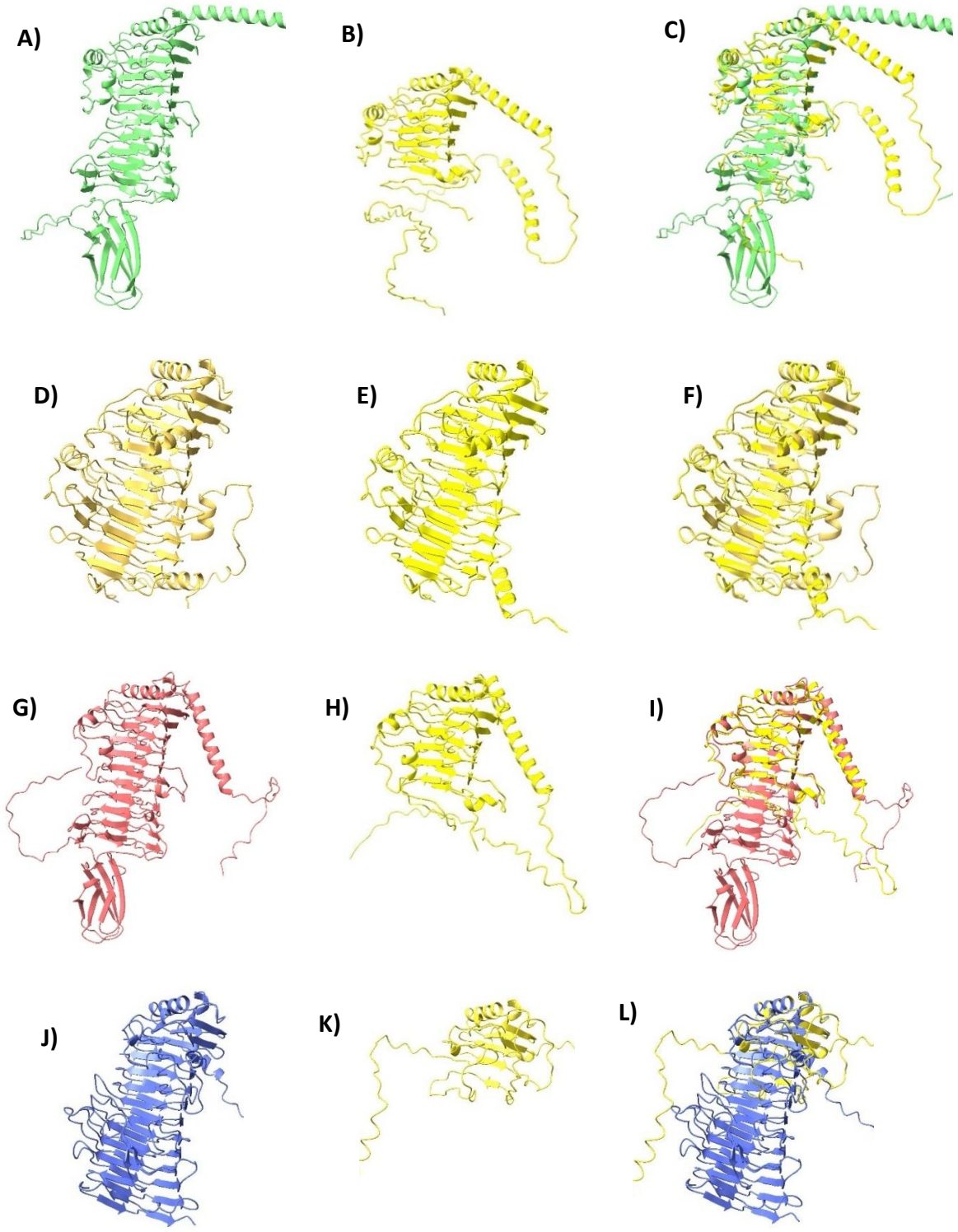


Figure 58 : Comparaisons des structures tridimensionnelles prédites des protéines PGs mutées dans le clone #138.

A) PpPG1 native. **B)** PpPG1 #138. **C)** Alignements de PpPG1 native et mutée #138. **D)** PpPG2 native. **E)** PpPG2 #138. **F)** Alignements de PpPG2 native et mutée #138. **G)** PpPG3 native. **H)** PpPG3 #138. **I)** Alignements de PpPG3 native et mutée #138. **J)** PPPG6 native. **K)** PpPG6 #138. **L)** Alignements de PpPG6 native et mutée #138.

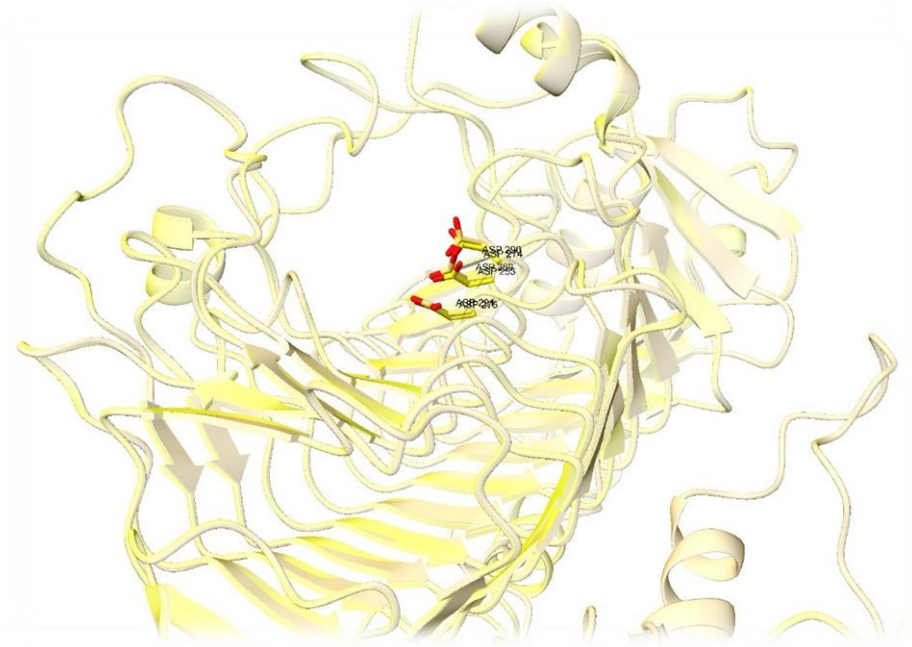
IV.2. Analyses structurales des polygalacturonases affectées

Les séquences en acides aminés des protéines mutées de ce clone ont été obtenues et utilisées pour prédire les structures tridimensionnelles de ces protéines, à l'aide d'Alphafold2 comme pour les autres protéines étudiées. Puis, ces structures prédites ont été alignées avec les structures des protéines natives sur le logiciel Chimera X. La protéine PpPG1 (en vert) **(figure 58 A)** vu de face, possède un CBM en extrémité C-terminale, ce qui est la même particularité que PpPG3. La protéine PpPG1 mutée du clone #138 (en citron) **(figure 58 B)**, est dépourvue d'une partie importante de son extrémité C-terminale, y compris son CBM. L'alignement de la PpPG1 native et de la PpPG1 #138 **(figure 58 C)** présente bien la différence structurale entre la protéine native et la protéine du clone #138.

La structure de la protéine native PpPG2 (en jaune) **(figure 58 D)** a déjà été étudiée précédemment. La protéine mutée PpPG2 #138 (en citron) **(figure 58 E)** reste très similaire à la protéine native malgré quelques acides aminés en moins. Sa structure tonneau β conserve une très haute similitude avec celle de la PpPG2 native lorsqu'elles sont alignées **(figure 58 F)**. La protéine PpPG3 native (en rouge) **(figure 58 G)** a elle aussi été étudiée précédemment. La protéine mutante PpPG3 #138 (en citron) **(figure 58 H)** présente un raccourcissement important au niveau du côté C-terminal de la protéine, la privant de son CBM et d'une partie de son tonneau β. La différence entre les structures de PpPG3 native et mutant #138 est visible dans leur alignement de structure **(figure 58 I)**. Enfin, la protéine PpPG6 (en indigo) **(figure 58 J)**, qui ne présente pas de CBM contrairement à PpPG1 et PpPG3, est étudiée pour la première fois ici. La protéine mutant PpPG6 #138 (en citron) **(figure 58 K)** présente une délétion très importante, la privant de tout son extrémité C-terminale. L'alignement de structures entre la protéine PpPG6 native et la mutant PpPG6 #138 **(figure 58 L)** montre cette différence flagrante.

Les triades d'acides aspartiques étant caractéristiques du site actif des polygalacturonases, elles ont été identifiées chez PpPG2 et PpPG6 **(figure 59)**, afin de comparer la présence et localisation de ces acides aminés entre les protéines natives et les mutantes CRISPR, par alignement de structures. Pour PpPG2, on remarque que le mutant CRISPR présente toujours la triade catalytique (D253, D274 et D275), parfaitement alignée avec celle de la forme native (D269, D290 et D291) **(figure 59 A)**.

A)



B)

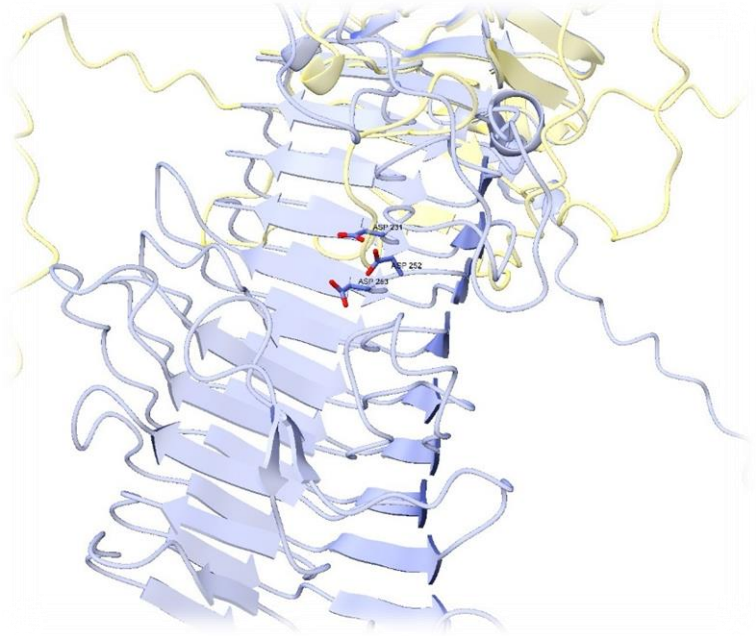


Figure 59 : Présentation des sites actifs de PGs et comparaisons avec les protéines mutées #138.

A) Alignement de structures et des triades catalytiques de PpPG1 native en beige (Ac. Aspartiques 269, 290 et 291) et mutée #138 en jaune (Ac. Aspartiques 253, 274 et 275). **B)** Alignement de structures et des triades catalytiques de PpPG6 native en indigo (Ac. Aspartiques 231, 252 et 253) et mutée #138, dont la mutation forme un codon stop avant le site actif.

En revanche, pour la protéine PpPG6, aucune triade d'acide Aspartique n'a été identifiée chez la protéine mutant PpPG6 #138. De part la présence d'un codon stop prématuré, la protéine ne s'est pas produite jusqu'au site actif, là où se trouve, en comparaison avec la native, ses acides aspartiques (D231, D252 et D253) **(figure 59 B)**.

De plus, aucune triade d'acide Aspartiques n'a été identifiée chez PpPG1 et PpPG3, dont les structures sont caractéristiques des protéines QRT3-like, ayant un mode d'action différent des protéines polygalacturonases GH28.

En raison de contraintes de temps, la caractérisation phénotypique des mutants, notamment obtenus par méthode CRISPR, n'a pas pu être menée dans le cadre de cette thèse. Toutefois, elle pourrait être réalisée ultérieurement en utilisant les mêmes approches que celles mises en œuvre pour l'analyse des mutants *pppg2*, *pppg3* et *pppg2/pppg3*.

DISCUSSION

Effets du PP60 sur le développement de *Physcomitrium patens*

Afin d'étudier le rôle des pectines dans le développement de *Physcomitrium*, notamment sa croissance bidimensionnelle (allongement et branchement des protonemas), nous avons tout d'abord utilisé l'application exogène de Polyphenon 60 (PP60) afin d'induire le remodelage des pectines. Le PP60 est un extrait riche en catéchines polyphénoliques issu du thé vert, incluant notamment l'épigallocatechine gallate (EGCG) et le gallocatéchine gallate (GCG). Ces polyphénols peuvent se lier à certains sites catalytiques d'enzymes modifiant les pectines. Les résultats obtenus sur *Physcomitrium* dans notre étude montrent une diminution de l'activité totale PG et PME des plantes soumises à un traitement PP60. Ces résultats sont en accord avec des travaux antérieurs indiquant que le PP60 inhibe l'activité des PGs, notamment par la présence d'EGCG. Des analyses structurales montrent en effet que l'EGCG peut se fixer dans le site actif des PGs, perturbant la liaison au substrat et bloquant l'hydrolyse des HG (Carton et al., 2024 ; Hocq et al., 2020). Par ailleurs, il a également été démontré que le PP60 inhibe l'activité des PMEs *in vitro*, notamment par interaction directe des catéchines avec le site actif enzymatique (Kim et al., 2020 ; Lewis et al., 2008). Les travaux réalisés durant cette thèse ont également permis de montrer que l'application de PP60 améliore le développement des protonémas de *P. patens*, se traduisant par une augmentation de l'aire du tissu protonémal de la plante. En observant davantage les différents types cellulaires, il a été observé une taille de cellules plus faible mais une augmentation du nombre de branchements, donc des ramifications, dans les caulonémas. En revanche, l'observation des protoplastes en régénération montre une réduction du branchement des chloronémas. Ce qui suggère que PP60 modifie différemment les modes de croissance de ces deux types cellulaires constituants les protonémas. Des résultats antérieurs montrent que des composés phénoliques proches de l'EGCG peuvent agir comme promoteurs de croissance des tubes polliniques, ayant une croissance apicale similaire à celle des protonémas. En effet, l'application de catéchines isolées du style de *Rhododendron mucronatum* augmente l'allongement des tubes polliniques dans plusieurs espèces testées, telles que *Camellia japonica*, *Pinus densiflora*, et *Rhododendron mucronatum* lui-même. Ceci suggère qu'au-delà de l'inhibition enzymatique, des catéchines peuvent influencer positivement la croissance (Ozawa et al., 1993). Dans un autre système végétal, le pollen de riz, l'application exogène de PP60 perturbe la distribution des pectines méthyl-esterifiées et déméthyl-esterifiées,

traduisant un effet direct ou indirect sur la structure des pectines dans la paroi (Y. J. Kim et al., 2020). La stimulation de la croissance des protonémas induite par le PP60 est opposée à celle montrée chez Arabidopsis où l'EGCG inhibe par exemple la croissance de la racine (Wolf et al., 2012). Les effets du PP60 pourraient ainsi être différents en fonction des tissus/organes, comme le suggère les résultats montrant qu'il n'a aucun effet sur le développement des gamétophores, qui correspondent à l'initiation de la croissance tridimensionnelle de la plante. Cette absence d'effet suggère que les mécanismes de remodelage pectique inhibés par le PP60 sont moins critiques pour le développement des tissus différenciés que pour la croissance filamentaire des protonémas.

Compte tenu de la diminution d'activité PME mesurée après application du PP60 **(figure 31 D)**, son effet sur le développement de *P. patens* pourrait être de réduire la déméthylation des pectines, limitant ainsi leur capacité à être hydrolysées par les PG, réduisant le remodelage des pectines et modifiant la structure de la paroi. Par la réduction de substrat disponible, les PGs seraient de fait moins actives. Ces deux actions pourraient entrainer des modifications de la rigidité ou de la cohésion pectique, modulant la croissance cellulaire. Si les résultats montrant, après application de PP60, une corrélation négative entre activité PG **(figure 31 C)** et augmentation de croissance **(figure 31 E et F)** peuvent apparaitre contre-intuitifs, ils traduisent sans doute la complexité de transfert des connaissances entre les effets *in vitro* et *in vivo*. Par exemple, si la relation entre la déméthylestérification des pectines et l'augmentation de la rigidité pariétale a été clairement démontrée *in vitro*, notamment par la formation de structures de type « boîtes à œufs », résultant de l'association des homogalacturonanes déméthylestérifiés avec des ions calcium Ca^{2+} (Ngouémazong et al., 2012), les observations *in vivo* révèlent des effets contrastés. En conditions physiologiques, la déméthylestérification des HG est en effet associée à une augmentation de l'élasticité pariétale, mesurée notamment par microscopie à force atomique, ce qui favorise la déformation de la paroi sous l'effet de la pression de turgescence (Peaucelle et al., 2008, 2015). Cette augmentation de l'élasticité est corrélée à une stimulation de la croissance cellulaire, à la fois à l'échelle de la cellule individuelle et de l'organe, et joue un rôle clé dans l'initiation des primordia, par exemple, ainsi que dans la croissance des cellules épidermiques (Peaucelle et al., 2008, 2015). De plus, la déméthylestérification des HG s'inscrit dans un contexte de régulation développementale plus large. Des gradients d'auxine contrôlent localement l'activité des pectine méthylestérases, générant des hétérogénéités spatiales de méthylation des HG qui se traduisent par des gradients mécaniques favorisant une croissance différentielle des tissus (Jonsson et al., 2021). À l'échelle nanostructurale, il a été proposé que la déméthylestérification des HG induit une réorganisation

des nanofilaments de pectines dans la paroi cellulaire, augmentant leur capacité d'expansion latérale et contribuant directement à l'assouplissement mécanique de la paroi indépendamment d'une simple augmentation de la pression de turgescence (Haas et al., 2020).

Compte tenu des résultats obtenus sur les caulonémas agravitropiques, montrant un effet négatif du PP60 sur la taille cellulaire **(figure 33 C et D)**, la modification des pectines pourrait conduire, dans ces cellules, à une paroi plus rigide et moins extensible, en raison d'une réduction du remodelage pectique, limitant ainsi l'allongement cellulaire. De nombreuses études ont en effet montré que le degré de méthylestérification des homogalacturonanes contrôle les propriétés mécaniques de la paroi, une diminution du remodelage pectique étant associée à une rigidification et à une inhibition de l'élongation cellulaire (Hongo et al., 2012 ; Levesque-Tremblay et al., 2015 ; Pelletier et al., 2010). Cependant, l'augmentation du branchement des caulonémas **(figure 33 B)** suggère que lorsque l'élongation apicale est freinée, les cellules réorientent leur croissance vers le développement latéral, initiant davantage de ramifications afin de maintenir l'expansion du réseau protonémal. Ce type de compensation entre allongement et branchement est cohérent avec des mécanismes décrits dans d'autres systèmes à croissance polarisée, où des contraintes mécaniques ou pariétales favorisent la multiplication de sites de croissance secondaires (Gu & Nielsen, 2013). À l'inverse, la diminution du branchement des chloronémas pourrait indiquer que ces cellules dépendent plus fortement de la dynamique PG/PME pour leur différenciation et l'initiation de branches. La perturbation de cette dynamique, *via* l'inhibition du remodelage des pectines, est connue pour réduire l'élasticité locale de la paroi nécessaire à l'émergence de nouvelles structures de croissance (Hongo et al., 2012 ; Peaucelle et al., 2011). Chez *Physcomitrium patens*, la présence d'homogalacturonanes et d'autres pectines dans les parois des protonémas est bien documentée, suggérant que ces polysaccharides contribuent au contrôle mécanique de la croissance et de la morphogenèse (Ye & Zhong, 2022). Ainsi, l'augmentation de l'aire globale des protonémas sous effet du PP60 peut être interprétée comme le résultat d'un biais de croissance, caractérisé par une ramification accrue des caulonémas et une ramification réduite des chloronémas, conduisant à un réseau plus étendu mais dont la dynamique cellulaire est modifiée. Une autre hypothèse s'appuie sur la dégradation des pectines et la libération des oligo-galacturonides lors de l'hydrolyse des HGs. Ces OGs peuvent agir comme des signaux pouvant influencer la croissance cellulaire et le développement en modulant des voies hormonales ou des réponses de stress (Ferrari et al., 2013). Si PP60 réduit l'activité de PG ou PME, la libération de ces oligo-galacturonides pourrait être modifiée, altérant les signaux qui régulent la transition entre chloronémas et caulonémas ou la balance entre croissance principale et le branchement.

Le rôle des PGs dans le développement de *Physcomitrium patens*

Le rôle des PGs dans le développement des protonémas

Les résultats obtenus au cours de cette thèse démontrent de manière convergente que les polygalacturonases (PGs) jouent un rôle déterminant dans le développement des protonémas de *Physcomitrium patens*, en contrôlant la croissance bidimensionnelle par l'expansion et la division cellulaires des chloronémas et des caulonémas. Les mutants *pppg2* et *pppg3* montrent une diminution significative de l'extension des protonémas **(figure 47)**, notamment des caulonémas **(figure 49)**, indiquant que ces enzymes sont nécessaires au maintien d'une croissance normale, un résultat cohérent avec de nombreuses études chez les plantes vasculaires montrant que les PGs participent activement au remodelage de la paroi lors des phases de croissance rapide (González-Carranza et al., 2007) et que l'activité de certaines PGs module effectivement l'extensibilité de la paroi pectique dans *Arabidopsis thaliana* (Xiao et al., 2017). Par exemple, chez *Arabidopsis thaliana*, la perte de *PGX1* (POLYGALACTURONASE INVOLVED IN EXPANSION1) conduit à une réduction de l'élongation des hypocotyles, un phénotype directement corrélé à une accumulation d'homogalacturonanes moins dégradées dans la paroi et à une diminution de l'extensibilité cellulaire, limitant ainsi la capacité des cellules à s'étirer sous pression de turgescence (Xiao et al., 2017).

Les phénotypes distincts observés entre les mutants simples ; réduction du développement des caulonémas pour *pppg2* **(figures 49 et 50)** et diminution de la taille cellulaire pour *pppg3* **(figure 51)** ; ainsi que le phénotype cumulatif du double mutant suggèrent ainsi des fonctions similaires mais spatialement ou mécaniquement différenciées de ces isoformes. Une organisation fonctionnelle déjà bien décrite pour les familles multigéniques de PGs chez *Arabidopsis thaliana*, où différents membres de la famille (*PGX1*, *PGX3*, etc.) sont exprimés dans des contextes tissulaires distincts et régulent des aspects variés de l'expansion cellulaire, de la morphogenèse des stomates et de la croissance des rosettes (Kim et al., 2006 ; Xiao et al., 2017). Ainsi, chez *Arabidopsis*, les mutants *pgx3* présentent des altérations de la morphogenèse des cotylédons, une densité et une dynamique stomatale modifiées ainsi qu'une réduction de la taille des rosettes. Ces observations confirmant que la perte d'une PG spécifique peut affecter simultanément des processus cellulaires fins (expansion, polarité, division) et des traits morphologiques globaux (Rui et al., 2017). Dans le cas de *Physcomitrium*, ces différences phénotypiques pourraient également être liées à une expression différentielle des PGs selon les

types cellulaires, *pppg3* étant plus fortement exprimée dans les tissus étudiés, mais aussi à des variations de composition pariétale entre chloronémas et caulonémas, notamment en homogalacturonanes (HG), dont la structure fine et le degré de méthylestérification conditionnent fortement la sensibilité aux PGs et leur accessibilité enzymatique (Wolf et al., 2009). Une analogie fonctionnelle peut être faite avec d'autres systèmes où les modifications de pectines modulent directement la morphogenèse et des réponses physiologiques : chez le riz (*Oryza sativa*), le mutant *OsPG1*, présente une altération de la densité stomatale et des défauts de fermeture des stomates, phénotypes associés à une modification du statut des HG déméthylestérifiés dans la paroi des cellules de garde, conduisant à une perte d'homéostasie hydrique du tissu foliaire (Zou et al., 2024).

De manière particulièrement intéressante, la surexpression induite de *PPPG4* conduit elle aussi à une réduction du développement des protonémas, produisant un phénotype semblable à celui des mutants de perte de fonction *pppg2* ; *pppg3* et *pppg2/pppg3* (**figure 56**). Ceci suggère l'existence d'une régulation fine de l'activité des PGs et qu'un excès d'activité enzymatique est aussi délétère qu'une absence. Ce type de relation non linéaire entre activité enzymatique et croissance a déjà été observé chez *Arabidopsis* pour plusieurs PGs impliquées dans l'élongation des hypocotyles, des feuilles ou des racines. Par exemple, l'induction de *PGX2* entraîne une augmentation de l'élongation des hypocotyles et de la taille des feuilles, mais s'accompagne également de modifications profondes de la structure pariétale, parfois induisant une rigidification secondaire ou des réponses compensatoires qui limitent la croissance ultérieure (Xiao et al., 2017). Cette interprétation est renforcée par les analyses de composition pariétale des mutants de délétion *pppg2*, *pppg3* et *pppg2/pppg3* à 28 jours, qui révèlent des variations modestes mais cohérentes en acide galacturonique et en mannose (**figure 43**), ainsi qu'une possible augmentation relative des hémicelluloses mise en évidence par FTIR (**figure 44**). Ces observations suggèrent l'existence d'une activation de mécanismes compensatoires au sein du réseau pariétal en cas de modification de l'activité polygalacturonase. De telles compensations ont déjà été décrites lors de perturbations du métabolisme des pectines, où la diminution d'un composant de la paroi entraîne souvent une augmentation relative d'autres polysaccharides afin de préserver l'intégrité mécanique (Du et al., 2020 ; Siemianowski et al., 2024).

Par ailleurs, l'inhibition exogène des PGs, mais aussi des PMEs, par le PP60 entraîne une augmentation de la croissance bidimensionnelle des protonémas, contrastant avec les phénotypes attendus, observés chez les mutants de délétion *pppg2*, *pppg3* et *pppg2/pppg3*. Ce type de divergence entre inhibition chimique et mutation génétique est déjà documenté et peut s'expliquer par des effets de compensation transcriptionnelle ou enzymatique à long terme dans les mutants, absents lors d'inhibitions transitoires, comme on l'observe notamment chez le mutant *pppg2* **(figure 46)**. Par exemple, chez *Arabidopsis*, les mutants *pglr* montrent une augmentation compensatoire de l'activité polygalacturonase globale, résultant d'une surexpression d'autres isoformes de PGs, ce qui atténue ou modifie les phénotypes attendus par rapport à une inhibition aiguë de l'activité enzymatique (Hocq et al., 2020). Chez les caulonémas agravitropiques traités, l'augmentation de la ramification associée à des cellules légèrement plus petites **(figure 33 C et D)** suggère que les PGs n'agissent pas uniquement sur l'expansion cellulaire mais participent également à la régulation du branchement des filaments. Un rôle morphogénétique des enzymes de remodelage de la paroi déjà suggéré dans des contextes où la polarité cellulaire et la répartition des contraintes mécaniques conditionnent la direction de croissance et la ramification (Peaucelle et al., 2011 ; Qiu et al., 2021). D'un point de vue de la mécanique pariétale, l'absence de certaines PGs dans les mutants de délétion pourrait conduire à une accumulation d'HGs moins dégradés, augmentant la rigidité pariétale et limitant l'expansion cellulaire. Tandis qu'une surexpression de *PPPG4* pourrait provoquer une dégradation excessive des HG, compromettant l'intégrité mécanique minimale nécessaire à la coordination de l'élongation et de la division cellulaire. Ce qui s'inscrit dans le concept d'un équilibre optimal entre rigidité et plasticité pariétale pour permettre la croissance (Cosgrove, 2016 ; Qiu et al., 2021). Cette idée est déjà explorée dans des travaux montrant que la méthylestérification des HGs et leur dégradation contrôlée par les PGs déterminent localement les propriétés mécaniques de la paroi, influençant directement la morphogenèse des tissus en croissance rapide en modulant l'élasticité et la capacité d'extension cellulaire (Peaucelle et al., 2008 ; Wolf et al., 2012).

À cet aspect mécanique s'ajoute l'hypothèse de l'implication des voies de signalisation, dans laquelle les produits de l'activité des PGs, en particulier les oligogalacturonides (OGs), jouent un rôle actif en tant que molécules signal. Il a notamment été démontré que les OGs agissent comme des DAMPs capables d'induire des réponses de défense et d'antagoniser la signalisation de l'auxine, conduisant à une inhibition de la croissance par répression des gènes auxino-dépendants (Ferrari et al., 2013 ; Savatin et al., 2011). Ainsi, une activité

polygalacturonase excessive, comme celle potentiellement induite dans le mutant *PPPG4* iOX, pourrait générer un afflux important d'OGs, activer des voies de défense et réprimer les voies auxiniques, contribuant au ralentissement du développement protonémal. Cette hypothèse est renforcée par des études montrant que certaines PGs sont directement intégrées aux réseaux de signalisation de l'auxine. Par exemple, la surexpression de *PGX2* chez *Arabidopsis* modifie la polarité de PIN2 en altérant les propriétés mécaniques de la paroi, ce qui perturbe l'ancrage membranaire et la polarisation de ce transporteur, entraînant une diffusion du flux d'auxine et une réduction de l'efficacité de la croissance directionnelle (Q. Zhang et al., 2022). Par ailleurs, des travaux plus récents indiquent que l'auxine peut inhiber ou induire l'expression de *PGs* spécifiques afin d'ajuster finement l'élasticité pariétale lors de l'élongation cellulaire ou de l'émergence de racines latérales (Jobert et al., 2021 ; Kubalová et al., 2025). Chez *Physcomitrium patens*, la conservation fonctionnelle de la signalisation auxinique, démontrée par les mutations affectant les gènes *Aux/IAA*, *AFB* ou *ARF*, qui altèrent la transition chloronéma–caulonéma et la morphologie cellulaire, suggère fortement que des interactions similaires entre paroi et signalisation hormonale sont à l'œuvre chez la mousse (Jang & Dolan, 2011 ; Koochak & Ludwig-Müller, 2021; Prigge et al., 2010). Enfin, bien que les strigolactones (SL) n'aient pas encore été directement reliées à l'activité des PGs chez *Physcomitrium*, les phénotypes hyper-ramifiés observés chez les mutants SL, combinés à la conservation des voies de signalisation des SLs et de l'auxine, suggèrent l'existence d'un réseau hormonal intégré contrôlant la morphogenèse protonémale. Dans ce cadre, le remodelage pariétal par les PGs pourrait constituer un point de convergence fonctionnel encore inexploré (Guillory & Bonhomme, 2021 ; Proust et al., 2011).

Le rôle des PGs dans le développement des gamétophores

Au cours des expérimentations réalisées, nous avons constaté que les polygalacturonases étudiées (PpPG2, PpPG3) ne semblent pas influencer de manière significative la production ou le développement des gamétophores de *Physcomitrium patens*. Le phénotypage détaillé des mutants *pppg2*, *pppg3* et *pppg2/pppg3* **(figure 48 A)**, ainsi que celui des plantes traitées avec l'inhibiteur PP60 **(figure 32)**, montrent que la densité de gamétophores reste inchangée par rapport au type sauvage ou au contrôle. De manière cohérente, la taille des gamétophores ne présente pas de variation significative chez les mutants **(figure 48 B)**, suggérant que les cellules responsables de l'initiation et de la croissance des bourgeons de gamétophores ne sont pas affectées par la modification d'activité PG.

Ces observations contrastent avec l'importance bien documentée des pectines et de leurs modifications enzymatiques dans le remodelage pariétal des tissus en croissance rapide, comme les filaments protonémaux. Cependant, nous savons que la composition et l'organisation de la paroi cellulaire varient selon le type cellulaire et le stade de développement. Chez *P. patens*, comme chez d'autres bryophytes, les parois cellulaires contiennent les principaux composants déjà bien décrits des parois primaires des plantes terrestres : cellulose, hémicelluloses (xyloglucanes, xylanes, glucomannanes), pectines et glycoprotéines. Cependant leur abondance varie selon les types cellulaires et les stades morphogénétiques (protonéma et gamétophore) (Ye & Zhong, 2022). Par exemple, des travaux d'immunocytologie montrent que les parois cellulaires de protonémas en croissance active sont particulièrement riches en homogalacturonanes dont le statut de méthylestérification influe sur l'élasticité pariétale, tandis que d'autres types de parois, notamment dans les tissus plus structurés comme les gamétophores, présentent une distribution différente des épitopes de pectines et d'hémicelluloses (Berry et al., 2016). Sur la base de ces descriptions, nous pouvons formuler l'hypothèse que la paroi des gamétophores possède une composition spécifique distincte de celle des protonémas, ce qui entraînerait une sensibilité différente aux variations de l'activité des polygalacturonases. Plus précisément, les parois des cellules de gamétophores semblent être spécifiquement enrichies en cellulose et en hémicelluloses (notamment en mannanes et xyloglucanes) et moins dépendantes de la matrice homogalacturonane pour leur extensibilité mécanique, ce qui pourrait réduire l'impact de la suppression ou de l'inhibition des PGs sur leur croissance diffuse. Cette hypothèse est cohérente avec des données immunocytochimiques montrant que, bien que les pectines soient présentes dans les parois de *P. patens*, y compris

dans les gamétophores, la distribution des polysaccharides varie fortement selon le type cellulaire, avec un marquage plus prononcé des hémicelluloses et de la cellulose dans les parois matures (Berry et al., 2016). La littérature sur la biologie des parois végétales renforce cette interprétation. Chez les bryophytes comme chez les trachéophytes, les tissus structurés et non en croissance rapide, tels que les organes reproducteurs, les tissus de soutien ou les parois matures, tendent à présenter une proportion plus élevée de cellulose et d'hémicelluloses et une proportion plus faible de pectines méthylestérifiées. Cette composition confère une rigidité pariétale accrue et une moindre dépendance aux activités enzymatiques pectolytiques (Ye & Zhong, 2022). Chez les angiospermes, il est bien établi que des tissus différenciés ont des parois moins riches en homogalacturonanes mobiles et plus intégrés dans un réseau cellulose-hémicellulose rigide, ce qui réduit la contribution des PGs à l'expansion cellulaire (Cosgrove, 2016 ; McFarlane, 2023 ; McFarlane et al., 2013).

Par ailleurs, le fait que la production de gamétophores reste stable malgré une réduction du nombre de caulonémas ou de leur division cellulaire suggère l'existence de mécanismes de compensation au sein du protonéma. Ce mécanisme permettant à la différenciation des bourgeons de gamétophores de se maintenir même lorsque certaines voies enzymatiques de remodelage pariétal sont altérées. Cette capacité de compensation pourrait impliquer une régulation locale de l'expression d'autres enzymes ou voies de signalisations afin de garantir le développement normal des structures reproductrices. Chez les bryophytes, des gènes impliqués dans la biosynthèse et la modification des polysaccharides pariétaux sont nombreux et montrent une certaine conservation évolutive avec les plantes vasculaires, ce qui suggère que des réseaux enzymatiques complexes peuvent ajuster localement la composition pariétale selon les besoins développementaux (McCarthy et al., 2014).

Obtention des mutants multiples par méthode CRISPR-Cas9

La stratégie de transformation par CRISPR-Cas9 mise en œuvre pour cibler les gènes codant pour des polygalacturonases (PGs) dans *Physcomitrium patens* a permis l'obtention de mutants multiples, confirmant l'efficacité de la méthode d'édition génétique multiplex par CRISPR dans ce modèle végétal. Dans notre expérience, le clone #138 présentait une réduction marquée de l'aire de ses protonémas après plusieurs repiquages, indiquant un important défaut de développement associé à l'édition de PGs. Après génotypage **(figure 57)** et analyses structurales des protéines résultantes codées après mutation, nous avons observé que PpPG1, PpPG3 et PpPG6 sont probablement non fonctionnels **(figures 58 et 59)**. En revanche, PpPG2 n'a subi qu'une petite délétion, conservant son intégrité structurelle et son site actif **(figure 58 D, E et F)**, suggérant que les défauts phénotypiques observés résultent principalement de la perte de fonction des trois premières PGs. L'usage du système CRISPR-Cas9 pour mutagenèse multiple est bien établi chez *P. patens*, notamment pour des familles multigéniques, telles que les phytochromes, où sept gènes ont été ciblés simultanément en une seule transformation, preuve de l'efficacité de ce système pour étudier des familles de gènes complexes (Lopez-Obando et al., 2021 ; Trogu et al., 2021). De manière complémentaire, des systèmes vectoriels CRISPR-Cas9 flexibles permettant l'édition de jusqu'à 12 loci simultanément ont été décrits, soulignant les possibilités d'extinction groupée de nombreux gènes dans cette espèce (Mallett et al., 2019).

Parmi les PGs mutées dans la lignée #138, *PpPG1* et *PpPG3* codent des protéines orthologues QRT3-like, en référence à des polygalacturonases telles que *BrQRT3* identifiée chez le chou chinois (*Brassica rapa*), où ce gène a été cloné et validé fonctionnellement comme requis pour la séparation des microspores, impliquant une dégradation ciblée de paroi pectique (Chu et al., 2024). Chez *Arabidopsis thaliana*, l'orthologue, *AtQRT3,* montre une fonction comparable dans la séparation des cellules microspores pendant la gamétogenèse, soulignant une activité conservée des PGs QRT3-like dans le remodelage pariétal ciblé lors de transitions cellulaires critiques. Cette similarité suggère que les PGs de type QRT3-like chez *P. patens* pourraient contribuer, dans certains contextes de croissance ou différenciation, à des modifications spécifiques de la matrice pectique (Rhee et al., 2003).

L'intégration de cet outil d'édition génomique de *P. patens* permet ainsi de générer des mutants simples, multiples ou combinatoires, par exemple pour évaluer le rôle de PGs de type QRT3-like. Cette stratégie de transformation CRISPR permet d'envisager des analyses plus détaillées qui peuvent révéler des fonctions redondantes, conditionnelles ou spécifiques des PGs selon les contextes de développement, tissulaires ou environnementaux.

Etudes des polygalacturonases de *Physcomitrium patens*

Analyses structurales

Les analyses structurales des protéines PpPG2 et PpPG4 montrent que ces enzymes possèdent des structures tridimensionnelles hautement conservées, similaires à celles décrites pour la polygalacturonase PGLR, malgré la présence de boucles spécifiques aux exo-polygalacturonases **(figure 37 et 52)** (Safran et al., 2023). On y retrouve également la triade catalytique d'acides aspartiques (Asp) correspondant au motif spécifique présent dans la famille des GH28 (Glycosyl Hydrolase Family 28, Pfam PF00295) à laquelle appartiennent les PGs **(figure 37 E, F et G)**.

L'identification des OGs produits par les polygalacturonases PpPG2, PpPG3 **(figure 41)** et PpPG4 **(figure 55)** sur l'acide polygalacturonique (PGA) indique que ces enzymes clivent préférentiellement les extrémités non réductrices des chaînes homogalacturonanes, produisant majoritairement des monomères d'acide galacturonique (DP1). Ce mode d'action est typique des exo-PGs, contrairement aux endo-PGs qui coupent aléatoirement à l'intérieur des chaînes (Yang et al., 2018). Des exo-PGs connues, telles qu'exo-PG1 et exo-PG2 d'*Aspergillus niger*, une exo-PG d'*Aspergillus giganteus*, ou une enzyme provenant d'*Aureobasidium pullulans*, produisent majoritairement des monomères, confirmant ce profil de produits (Bennamoun et al., 2016 ; Pedrolli & Carmona, 2010 ; Sakamoto et al., 2002). Ces observations renforcent la classification de PpPG2, PpPG3 et PpPG4 comme exo-polygalacturonases.

Les analyses structurales **(figure 38)** et phylogénétiques **(figure 35)** indiquent que la protéine PpPG3 appartient à la sous-famille QRT3-like, qui présente des différences structurales importantes par rapport aux PGs. Comparée à AtQRT3, qui a été caractérisée comme étant une endo-polygalacturonase (Rhee et al., 2003), PpPG3 possède une boucle structurale supplémentaire, proche du site actif **(figure 38 G)**. Cette boucle serait sans doute responsable de l'action de PpPG3, agissant comme une exo-PG, libérant des OGs à partir de l'extrémité non réductrice de la chaîne des HGs. Bien que la présence de domaines catalytiques GH28 conservés chez les QRT3-like a été démontrée (Yang, Yu, et al., 2018), aucune étude structurale n'a encore permis d'identifier les résidus précis responsable de la catalyse dans cette sous-famille de PGs. La localisation exacte du site actif de PpPG3 n'a donc pas été directement identifiée, mais l'alignement structural et la conservation des domaines catalytiques peuvent donner des indices sur les résidus concernés.

Les PGs de la sous-famille QRT3-like semblent se distinguer des PGs classiques par une structure différente, incluant notamment la présence d'un CBM (Carbohydrate Binding Module). Le CBM, présent sur PpPG3 **(figure 38 A)** et PpPG1, ainsi que les autres protéines QRT3-like, suggère une forte affinité pour les polysaccharides de la paroi, facilitant la liaison aux homogalacturonanes et stabilisant l'interaction enzyme-substrat (Gilbert et al., 2013 ; Montanier et al., 2009 ; Rhee et al., 2003). Il a été montré que les CBM peuvent se lier à des polysaccharides, optimisant la liaison enzyme-substrat et l'efficacité catalytique (Gilbert et al., 2013). Certains CBM se lient spécifiquement à des chaînes linéaires de pectines, notamment au niveau des régions aux motifs non méthylestérifiés (Trovão et al., 2023). Ces caractéristiques suggèrent une spécialisation fonctionnelle particulière de PpPG1 et PpPG3 chez *Physcomitrium patens*, probablement adaptées à des motifs pectiques ainsi que des contextes tissulaires ou développementaux précis dans les protonémas.

Cette spécialisation fonctionnelle des PGs est cohérente avec de nombreuses études montrant que différentes isoformes de PGs contribuent à des processus morphogénétiques distincts selon leur localisation, leur mode d'action et leurs propriétés biochimiques. Par exemple, chez *Arabidopsis*, les PGs de la famille PGX participent à l'élongation des hypocotyles, à la croissance des feuilles et à la morphogenèse des stomates, tandis que d'autres PGs interviennent dans l'abscission, la séparation cellulaire ou la formation des organes reproducteurs (González-Carranza et al., 2007 ; Kim et al., 2006 ; Rui et al., 2017 ; Xiao et al., 2017). Ces travaux montrent clairement que la diversité structurale et fonctionnelle des PGs

sous-tend une division de fonction pour le remodelage pariétal. Dans ce contexte, la coexistence, chez *Physcomitrium patens*, d'endo-PGs putatives, d'exo-PGs comme PpPG2 et PpPG4, et d'exo-PGs QRT3-like comme PpPG1 et PpPG3, suggère une coopération fonctionnelle, où certaines enzymes peuvent assurer un remodelage rapide des extrémités des homogalacturonanes, tandis que d'autres contrôlent plus finement la dynamique de liaison, de clivage et de signalisation associée aux fragments pectiques. Cette complémentarité fournit une base conceptuelle solide pour l'utilisation de mutants combinatoires générés par CRISPR/Cas9 ou par édition de bases, afin de disséquer le rôle précis de chaque classe de PGs dans la croissance, l'architecture filamentaire et la morphogenèse des protonémas de *Physcomitrium patens*.

Caractérisation biochimique

Les résultats obtenus sur les polygalacturonases PpPG2, PpPG3 et PpPG4 montrent qu'il est possible de produire ces protéines par système hétérologue *Pichia pastoris* et de les purifier. Les analyses biochimiques effectuées révèlent des profils d'activité distincts mais convergents vers une forte préférence pour les homogalacturonanes déméthylés **(figure 40 et 54)**. En effet, PpPG2 et PpPG3 présentent une activité nettement plus élevée sur l'acide polygalacturonique (PGA), tandis que leur activité est fortement réduite sur des substrats pectiques plus complexes tels que la pectine de betterave sucrière (SBP), partiellement méthylée (DM ~42 %) et acétylée (DA ~31 %), ou sur le rhamnogalacturonane I (RG-I) **(figure 40 A)**. Ce profil est caractéristique des polygalacturonases, dont l'activité est connue pour être fortement inhibée par la méthylestérification et l'acétylation des résidus d'acides galacturoniques, ces modifications limitant l'accessibilité du site actif aux liaisons α-1,4 (Mohnen, 2008 ; Yang et al., 2018).

Dans l'ensemble, ces résultats biochimiques indiquent que PpPG2, PpPG3 et PpPG4 sont plus actives sur des homogalacturonanes faiblement substitués, suggérant un rôle privilégié dans le remodelage localisé de la matrice pectique plutôt que dans la dégradation globale de pectines complexes. Cette spécialisation est cohérente avec les modèles actuels de la dynamique pariétale végétale, dans lesquels différentes PGs coopèrent avec les PMEs pour moduler finement la plasticité de la paroi en fonction du contexte cellulaire et développemental (Safran et al., 2023 ; Wolf et al., 2009 ; Yang et al., 2018).

Les températures et pH optimaux mesurés pour les polygalacturonases de *Physcomitrium patens* étudiées montrent des différences modérées mais cohérentes avec les propriétés biochimiques classiquement décrites pour les PGs végétales. PpPG2 présente une activité maximale à pH 6, tandis que PpPG3 et PpPG4 ont des pH optimaux plus acides, respectivement pH 5 et pH 4 **(figure 40 et 54)**. Des valeurs comparables ont été rapportées pour de nombreuses polygalacturonases caractérisées chez les plantes, les champignons et les micro-organismes, soulignant la forte conservation fonctionnelle de la famille GH28. Par exemple, des polygalacturonases de tomate (*Solanum lycopersicum*), impliquées dans le ramollissement des fruits, présentent des optima d'activité à un pH acide proche de 4–4,5 (Chun & Huber, 1997). De même, des exo-polygalacturonases fongiques d'*Aspergillus niger* ou d'*Aureobasidium pullulans* montrent des activités maximales à pH 4–5, condition favorable à l'hydrolyse des homogalacturonanes déméthylés (Anand et al., 2017 ; Bennamoun et al., 2016). Cette convergence reflète la conservation du mécanisme catalytique des GH28, reposant sur une triade de résidus aspartiques hautement conservés, impliqués dans la catalyse acide-base et la stabilisation de l'état de transition lors de l'hydrolyse de la liaison α-1,4-galacturonique (Anand et al., 2017 ; Bennamoun et al., 2016 ; Pagnonceli et al., 2019). Des analyses structurales récentes de polygalacturonases végétales et microbiennes, incluant des approches de modélisation et de cristallographie, confirment le rôle central de ces résidus et montrent que de légères variations locales de structure peuvent moduler les optima de pH sans altérer le cœur du mécanisme catalytique (Safran et al., 2023). Ces paramètres d'optimum traduisent ainsi un état de protonation favorable des résidus catalytiques, condition indispensable à l'attaque nucléophile de la liaison glycosidique, tandis que des écarts de pH induisent des perturbations électrostatiques au niveau du site actif et une diminution de l'efficacité catalytique (Abbott & Boraston, 2008 ; Battisti et al., 2024).

Les températures optimales mesurées pour les polygalacturonases de *Physcomitrium patens* sont également cohérentes avec les propriétés biochimiques classiquement décrites pour les PGs végétales et microbiennes. La protéine PpPG2 présente une activité maximale autour de 40 °C, tandis que PpPG3 et PpPG4 atteignent leur optimum à environ 50 °C. Des valeurs comparables ont été rapportées pour de nombreuses polygalacturonases caractérisées chez les plantes, les champignons et les micro-organismes, soulignant la forte conservation fonctionnelle de la famille GH28 tout en illustrant une diversité d'adaptations physiologiques. Par exemple, une exo-PG purifiée d'*Aspergillus niger* MTCC 478 présente une température optimale d'activité autour de 50 °C (Anand et al., 2017). Des PGs d'autres champignons tels

Que *Thermoascus aurantiacus* ou *Penicillium* spp. montrent des optima thermiques encore plus élevés (≈60–65 °C), compatibles avec leurs rôles dans des environnements thermophiles ou industriels (Martins et al., 2013). De même, certaines PGs de *Talaromyces leycettanus* conservent une activité optimale jusqu'à 70 °C, attestant de la variabilité des adaptations thermiques chez les GH28 tout en restant dans la plage généralement rencontrée (30–70 °C) (Y. Li et al., 2017). Chez les PGs exprimées par des levures ou des moisissures telles que *Rhizopus oryzae*, les températures optimales varient souvent de 30 à 40 °C, soulignant que même au sein d'une même famille, la variabilité de ces paramètres enzymatiques est large (Mertens & Bowman, 2011). Tous ces paramètres reflètent la conservation du mécanisme catalytique des GH28, reposant sur une triade de résidus aspartiques hautement conservés, impliqués dans la catalyse acide-base et la stabilisation de l'état de transition lors de l'hydrolyse de la liaison α-1,4-galacturonique (Tu et al., 2016). Des analyses structurales récentes de polygalacturonases végétales et microbiennes confirment le rôle central de ces résidus et montrent que de légères variations locales de structure peuvent moduler les optima de température. Par exemple, les modifications de boucles autour du site actif affectent la stabilité thermique (Tu et al., 2021).

Il est toutefois important de souligner que ces optima mesurés *in vitro* ne reflètent pas nécessairement les conditions physiologiques *in vivo*. Chez *Physcomitrium patens*, les cellules se développent à des températures plus basses et dans des micro-environnements pariétaux dont le pH est finement régulé, suggérant que l'efficacité biologique de ces enzymes repose davantage sur leur stabilité, leur affinité pour le substrat et leur localisation subcellulaire que sur leur vitesse catalytique maximale (Cosgrove, 2016; Geitmann, 2010). Enfin, les variations d'activité observées entre différents lots de protéines purifiées sont compatibles avec des différences de repliement, de stabilité ou de micro-hétérogénéité structurale, un phénomène bien documenté, et particulièrement fréquent chez les hydrolases pariétales riches en feuillets β (Hou et al., 2023; Safran et al., 2023).

Conclusion

Les travaux réalisés durant cette thèse démontrent que les polygalacturonases jouent un rôle central dans la régulation du développement des protonémas de *Physcomitrium patens*, en modulant finement les propriétés biochimiques, et sans doute mécaniques de la paroi cellulaire. Les approches combinées, incluant l'inhibition par le PP60, l'analyse de mutants de délétion et de surexpression, obtenus par recombinaison homologues, ainsi que la génération de mutants multiples par CRISPR-Cas9, ont permis de mettre en évidence une relation étroite entre l'activité des PGs et les modes de croissance cellulaire. Les résultats montrent que les perturbations de l'activité PG affectent principalement la croissance bidimensionnelle des protonémas, en influençant l'élongation, la division et le branchement des chloronémas et des caulonémas. À l'inverse, le développement de la croissance tridimensionnelle, donc des gamétophores, apparaît relativement robuste face à ces perturbations, suggérant une dépendance moindre au remodelage des homogalacturonanes et/ou une compensation par d'autres mécanismes pariétaux. La caractérisation biochimique et la modélisation structurale des PGs de *P. patens* révèlent une diversité fonctionnelle au sein de cette famille enzymatique, incluant des exo-polygalacturonases classiques (PpPG2 et PpPG4) et des QRT3-like (PpPG1 et PpPG3) ayant une structure atypique, ainsi que des endo-PG. De façon remarquable, chez *Physcomitrium*, la classe des exo-PGs représente une proportion plus importante de la famille multigénique par rapport à ce qui est rencontré chez les plantes à fleurs. Enfin, l'ensemble des données s'inscrit dans une conception plus large, dans laquelle la paroi cellulaire apparaît comme une structure mécanique dans laquelle les polygalacturonases présentent un rôle clé dans la régulation du développement végétal, mais également potentiellement dans la signalisation notamment *via* la production d'oligogalacturonides et leur interaction avec les voies hormonales.

Perspectives générales

Les résultats obtenus ouvrent de nombreuses perspectives pour mieux comprendre le rôle des polygalacturonases (PGs) dans le remodelage pariétal et le développement de *Physcomitrium patens*. D'abord, au niveau des protonémas, l'analyse des mutants *pg* suggère que ces enzymes participent à la morphogenèse et à la croissance initiale : Les PpPGs peuvent moduler le degré de polymérisation des homogalacturonanes (HG) et influencer la composition et les propriétés mécaniques de la paroi. Des analyses complémentaires des mutants sont nécessaires pour approfondir ces observations. En particulier, la caractérisation plus poussée des lignées mutantes étudiées permettrait de mettre en regard l'activité PG spécifique et les phénotypes observés. Parmi celles-ci :

1) Evaluer les conséquences des changements d'expression/activité PG et mesurer l'impact spatio-temporel sur la structure des pectines.

- La quantification de l'expression des *PGs* par RT-qPCR afin de détecter d'éventuelles régulations croisées ou compensations dans les mutants.
- L'immunolocalisation fine des pectines et des hémicelluloses pour cartographier les différences de composition et leur distribution entre chloronémas, caulonémas et gamétophores.
- Le dosage de l'activité PG totale, notamment chez les mutants surexpresseur PPPG4 iOX, afin de vérifier l'impact de la surexpression sur l'activité enzymatique globale.

2) Etudier les effets précoces des extinctions ou sur-expressions de gènes avant la mise en place des mécanismes de compensation géniques.

- L'analyse précoce de la composition pariétale, c'est-à-dire avant 7 jours, pour identifier les changements initiaux en HG, cellulose ou hémicelluloses susceptibles d'influencer la croissance initiale.
- Le suivi temporel de la transition chloronémas vers caulonémas pour déterminer si les différences observées reflètent un retard développemental ou un effet direct sur la paroi.

Au niveau des gamétophores, les PGs semblent avoir un impact limité, ce qui justifie des études ciblées pour comprendre cette résistance apparente dans les études que nous avons menées. Nous pourrions envisager de caractériser finement les différences dans la structure pariétale et son remodelage au cours du passage de la croissance bi-dimensionnelle vers la croissance tri-dimensionnelle.

- La séparation des gamétophores et des protonémas pour analyser distinctement la composition pariétale.
- La mesure des activités PG et PME dans chaque type de tissu afin d'évaluer l'activité enzymatique locale.
- L'immunolocalisation des pectines et hémicelluloses pour visualiser la distribution et la localisation des méthylestérifications des HG.
- L'analyse de l'expression des différentes *PGs* afin d'identifier l'éventuelle spécificité tissulaire des isoformes
- L'analyse des mécanismes compensatoires : suivi de l'expression des PGs et PMEs dans les mutants pour identifier d'éventuelles régulations qui maintiennent le développement des gamétophores.

Enfin, la génération de mutants multiples par CRISPR-Cas9 représente une approche prometteuse pour relier l'activité enzymatique de chaque structure/mode d'action (endo-, exo-, QRT-like), ou chaque isoforme à son rôle spécifique dans le développement de *Physcomitrium*.

- Cibler simultanément des gènes appartenant à différents groupes phylogénétiques (ex. Pp3c18_2210, Pp3c15_15300 et Pp3c23_3890, endo-putatives ; puis Pp3c5_16250, Pp3c16_9310, Pp3c16_7320 et Pp3c6_7160, exo-putatives) permettra de distinguer les fonctions des endo- vs exo-polygalacturonases.
- Cibler uniquement des endo-polygalacturonases pour comparer leurs fonctions avec les seules exo-polygalacturonases étudiées dans ce travail de thèse.
- Corréler les modifications pariétales par l'utilisation de l'AFM ou la microscopie Brillouin, aux mutations, permettra d'élucider les rôles complémentaires ou redondants des PGs dans le remodelage pectique et le développement cellulaire.
- L'association de ces mutants avec des lignées rapportrices de la signalisation hormonale (auxine, par exemple) offrirait une vision des interactions entre remodelage pariétal et signalisation, et permettrait de tester l'hypothèse de régulations compensatoires dans les différents tissus.

Enfin, dans le cadre de notre étude, nous avons identifié 2 gènes codants des QRT3-like, dont PpPG3, dont nous avons déterminé les caractéristiques biochimiques ainsi que le mode d'action de type exo-PG. Ces enzymes sont peu étudiées et ne disposent pas du site actif rencontré dans les GH28. Il serait intéressant, par des approches bio-informatiques d'homologies structurales, de simulations de liaison au substrat, puis de mutagénèse, de déterminer les acides-aminés catalytiques de cette famille conservée de protéines. Une analyse plus poussée des spécificités de substrat pourrait également être envisagée, afin de déterminer leurs particularités potentielles.

De manière globale, ces approches combinées d'analyse d'expression, immunolocalisation, activité enzymatique, composition pariétale et génération de mutants multiples, fournissent un cadre complet pour explorer le rôle précis des PGs dans la croissance, la morphogenèse et la différenciation des protonémas et gamétophores de *Physcomitrium patens*.

MATERIELS ET METHODES

CHAPITRE I : ETUDES BIOINFORMATIQUES

I.1. Arbre phylogénétique

Un total de 13 polygalacturonases (PGs) putatives ont d'abord été prédites chez *Physcomitrium patens* à l'aide de recherches par analogies de séquences protéiques par BLASTp, sur Phytozome, puis vérification par comparaison de structures simulée grâce à Alphafold, à partir de séquences de PGs de *P. patens* déjà connues. Les séquences en acides aminés des 13 PGs de *Physcomitrium patens*, 5 PGs de *Marchantia polymorpha* et 68 PGs d'*Arabidopsis thaliana* ont été alignées en utilisant Clustal Wallis (ClustalW) au sein du logiciel MEGA X (Kumar et al., 2018). Cet algorithme se base sur des alignements par paires (pairwise) où chaque paire de séquences est alignée selon les similarités les plus élevées, puis la distance évolutive entre chaque paire est calculée sur la base d'une matrice BLOSUM (Tamura et al., 2021). Les distances obtenues servent ensuite à construire un arbre phylogénétique établissant l'ordre selon lequel les séquences sont alignées, en se basant sur leur pourcentage de similarité (Maximum Likelihood Tree). Pour la construction de l'arbre, la méthode bootstrap a été utilisée avec 100 rééchantillonnages afin de calculer le pourcentage de fiabilité pour chaque branche.

I.2. Analyse des séquences

La présence des peptides signaux putatifs au sein des séquences protéiques de PpPG2, PpPG3 et PpPG4 a été prédite en utilisant l'outil SignalP 6.0 (https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/). Les structures tridimensionnelles ont été prédites en utilisant ColabFold v1.5.5 basé sur l'algorithme d'AlphaFold2 (Jumper et al., 2021). Les sites de glycosylation ont été prédits en utilisant NetNGlyc 1.0 (https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetNGlyc-1.0/) pour les N-glycosylations, et NetOGlyc 4.0 (https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetOGlyc-4.0/) pour les O-glycosylations. Les alignements de structures prédites ainsi que les analyses structurales ont été réalisées à l'aide du logiciel CHIMERA X (Pettersen et al., 2021).

I.3. Expressions des PGs de *P. patens*

Les niveaux d'expressions des 13 gènes codant pour des polygalacturonases chez *Physcomitrium patens* ont été obtenus en utilisant PEATmoss (Physcomitrella Expression Atlas Tool). Cet outil est un atlas d'expression génique interactif dédié à cet organisme et rassemble les données transcriptomiques provenant de différentes plateformes et méthodes : RNA-seq avec calcul de FPKM et contrôle de réplicats (Perroud et al., 2018), microarrays CombiMatrix (Hiss et al., 2014) et NimbleGen (Ortiz-Ramírez et al., 2016). Les données sont présentées en FPKM (Fragment Per Kilobase of transcript par Million mapped fragments), ce qui correspond à une mesure normalisée d'expression génique dans les données RNA-seq. Le FPKM compte le nombre de fragments de lecture s'alignant sur un gène, puis le divise par la longueur du gène en kilobase pour corriger l'erreur causée par la taille. Enfin, ce nombre est divisé par le nombre total de fragments mappés (en millions) pour corriger la profondeur de séquençage. Ceci permet la comparaison de l'expression d'un gène à l'intérieur d'un échantillon, mais aussi entre échantillons. Les données d'expressions par organes ont été obtenus sur eFP Physco qui utilise les données issues des résultats microarrays NimbleGen où les valeurs sont présentées en valeurs brutes normalisées (Fernandez-Pozo et al., 2022).

I.4. Analyses statistiques

Les expériences de phénotypage de différentes conditions (Contrôle, PP60 10µg/mL ou PP60 50µg/mL) ou génotypes (WT, *pppg2*, *pppg3* ou *pppg2/pppg3*) au même temps donné sont analysées par ANOVA à un facteur (One-way ANOVA) avec le test de comparaison multiple de Tukey. Tandis que les expériences de phénotypages de différentes conditions ou génotypes à différents temps de développement (J7, J14, J21 ou J28) sont analysées par ANOVA à deux facteurs (Two-way ANOVA) avec le test de comparaison multiple de Tukey. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism 8. La normalité a préalablement été vérifiée par test de Shapiro-Wilk. Puis l'homogénéité des variances grâce au test de Levene.

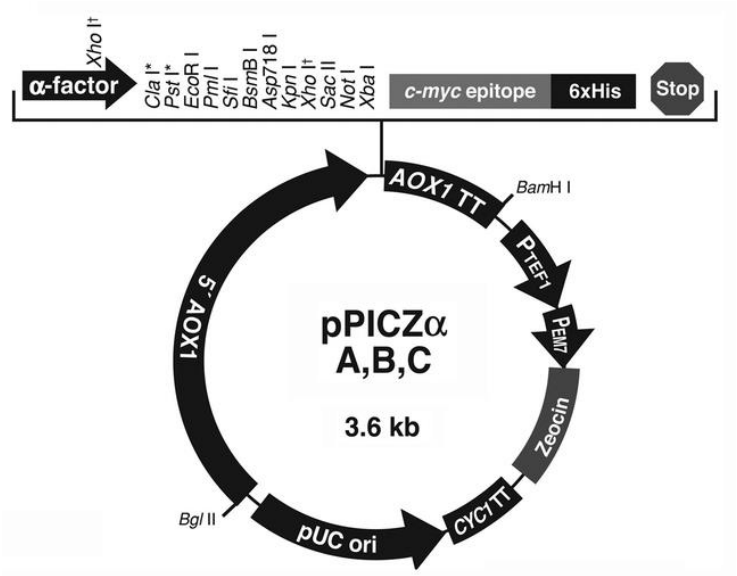


Figure 60 : Schéma du vecteur pPICZα utilisé pour la production de protéine en système hétérologue *Pichia pastoris*.

Le site de clonage est précédé par la séquence signal de sécrétion par l'alpha (α-factor) et des tags c-myc et 6xHis. Le promoteur *AOX1* permet l'induction par le méthanol tandis que le gène de sélection permet la résistance des levures transformées à l'antibiotique Zéocine.

(Lin-Cereghino, 2007)

CHAPITRE II : ETUDES BIOCHIMIQUES

II.1. Production et purification des polygalacturonases

Les protéines PpPG2, PpPG3 et PpPG4 ont été produites par le système hétérologue *Pichia pastoris* suite à leur transformation par le un vecteur d'expression pPICZαB **(figure 60)** contenant les séquences codantes optimisées pour Pichia de chacune des protéines. Ce vecteur, qui contient le promoteur *AOX1*, permet une induction au méthanol, la sécrétion de la protéine dans le milieu grâce à la séquence signal du facteur alpha (α-factor), ainsi que la séquence permettant la fusion d'une étiquette (tag) de 6 histidines en C-terminal des protéines. La production des protéines se fait dans le surnageant de culture (Damasceno et al., 2012). La méthode de production, comme présentée dans la **figure 61**, se fait pendant cinq jours de production à 250 rpm. Le premier jour de culture se fait dans du BMGY (Buffered Glycerol-complex Medium ; 1% Yeast extract, 2% Peptone, 1,34% Yeast Nitrogen Base, 4.10^{-5}% Biotine, 1% Glycérol, 100mM de phosphate de potassium, pH6), à 30°C et agitation à 250 rpm, afin de permettre la prolifération cellulaire des levures. Le second jour de culture, la quantité de levure optimale (1 unité de DO à 600nm par mL) est transférée dans 100 mL de BMMY (Buffered Methanol-complex Medium), dont la composition est similaire à celle du BMGY mais où le glycérol 1% est remplacé par du méthanol à 0,5% de volume final. La température est baissée à 22°C afin d'améliorer la stabilité structurale des protéines produites dans *Pichia pastoris* (Wang et al., 2009 ; Wu et al., 2012). Les troisième et quatrième jours de culture, du méthanol (0,5% de concentration finale) est ajouté pour maintenir l'induction. Le cinquième et dernier jour de culture, le surnageant est récolté, centrifugé à 3300 rpm (1500 rcf) pendant 7 minutes pour séparer le culot cellulaire, puis filtré à 0,45 µm à vide (Corning Bottle-Top Vacuum Filter). Les surnageants filtrés sont ensuite concentrés et le tampon remplacé par filtration tangentielle de 10 kDa (Pierce™ Crossflow Filtration Cassettes 10kDa MWCO), jusqu'à un volume final de 50 mL (tampon de purification, NaP 25mM + NaCl 500 mM pH 7,4).

La purification des surnageants de protéine concentrés se fait par chromatographie d'affinité à travers des colonnes de nickel (Cytiva, HisTrap Excel) permettant de capturer les queues poly-histidines (His-tag) présentes aux extrémités C-terminales des protéines recombinantes.

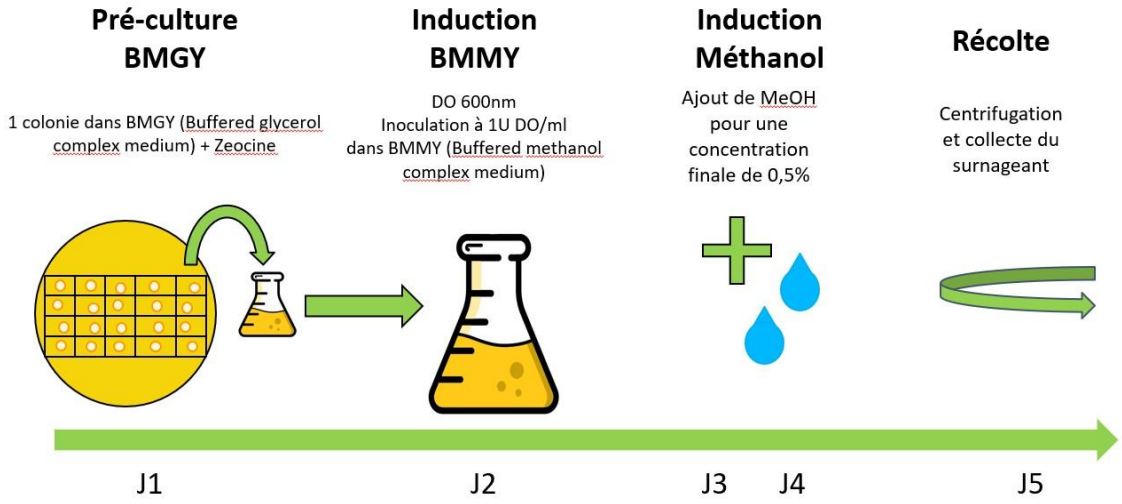


Figure 61 : Schéma de la méthode de production de protéine par système hétérologue *Pichia pastoris*.

Après équilibration de la colonne avec un volume de tampon de purification, les 50 mL de surnageant concentré sont chargés sur la colonne de nickel à une vitesse de 1 mL.min^{-1} et la fraction non-retenue est collectée (FT). La purification des protéines s'effectue par passages de solutions d'imidazole de concentrations croissantes à travers la colonne de nickel ; 25 mM pour la solution de lavage (Wash) et 250 mM pour la solution de purification (Elution)La fraction correspondant à l'élution est concentrée à l'aide d'Amicon 10 kDa (UFC9010 Millipore – Sigma Aldrich) et transférée dans le tampon d'activité grâce à une colonne Spintrap (GE28-9031-32, Cytiva). Pour PpPG2 et PpPG4, il s'agit deNaOAc 50mM à pH 5,75, et pour PpPG3 de sodium phosphate NaP 50mM à pH 5,75.

II.2. Dosage des protéines

La concentration en protéines est estimée par méthode colorimétrique grâce au kit de dosage BCA (Pierce^{TM} BCA Protein Assay Kit, référence 23227, ThermoFischer Scientific). Les gammes étalons sont préparées à partir d'albumine sérique bovine (BSA) à 2mg/mL, diluée dans le tampon NaOAc 50mM pH 5,75 à des concentrations finales comprises entre 0 et 2000µg/mL (0, 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 et 2000µg/mL), puis 25 µL de chaque point de gamme est déposé en duplicat dans une plaque 96 puits. Les extraits protéiques sont déposés en duplicat dans deux dilutions avec le tampon, respectivement 5 µL et 10 µL dans 25 µL total. Les deux réactifs A et B du kit sont mélangés dans un rapport volumique de 50:1, puis 200 µL sont déposés dans chaque puits. Après homogénéisation, la plaque est incubée 30 minutes à 37°C. L'absorbance est ensuite mesurée à 562 nm dans un lecteur de plaque (Infinite M nano, 30190086, TECAN). Lors des calculs de concentrations, le blanc est soustrait pour corriger le signal, puis les concentrations des dilutions protéiques sont déterminées à partir de la courbe d'étalonnage obtenue.

Tableau 2 : Tableau des composants pour la préparation des gels SDS-Page.

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate. APS : Ammonium persulfate. TEMED : N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine

Gel de résolution		**Gel de concentration**	
Composant	**Volume** (Vf 10mL)	**Composant**	**Volume** (Vf 5mL)
dH_2O	2,05 mL	dH_2O	3,125 mL
30% Acrylamide/ Bis-acrylamide	4 mL	30% Acrylamide/ Bis-acrylamide	625 µL
1M Tris-HCl pH 8,8	3,75 mL	1M Tris pH 6,8	625 µL
10% SDS	100 µL	10% SDS	50 µL
10% APS	100 µL	10% APS	50 µL
TEMED	8 µL	TEMED	5 µL

II.3. Identification des protéines

Les protéines purifiées sont dénaturées puis chargées sur un gel polyacrylamide contenant du SDS (SDS-Page), un détergent qui charge négativement la protéine. La composition des gels de résolution, dans lesquels les protéines migrent en fonction de leur masse moléculaire, et des gels de concentration, surplombant celui de résolution, dans lequel les protéines vont se concentrer avant de migrer dans le gel de résolution, est décrite dans le **tableau 2**. Pour chaque protéine purifiée, 4µg sont mélangés à 5 µL de tampon de charge 5X (Laemmli buffer) et dilué dans de l'eau dans un volume total de 25 µL, puis est dénaturé pendant 15 minutes à 98°C. La migration s'opère à 180 V pendant environ 30 minutes. Après la séparation des protéines, le gel est coloré au bleu de Coomassie R-250 (PageBlue Protein Staining Solution, Thermo Fischer Scientific) pendant 30 minutes, où le colorant se lie par liaisons non-covalentes avec les protéines, puis lavé à l'eau, de façon à visualiser les différentes protéines en fonction de leurs poids moléculaires en comparaison avec un marqueur de taille (Prestained Protein Ladders).

Pour confirmer la présence de la protéine d'intérêt, les protéines séparées dans un gel SDS-PAGE doivent être transférées sur une membrane PVDF, où elles pourront être détectées par anticorps (Western-Blot). Le gel est alors placé dans un tampon cathode (25mM Tris pH9,4, 40mM glycine, 10% EtOH) pendant 15 minutes. La membrane PVDF préalablement découpée est placée dans une solution d'éthanol EtOH 100% pendant 15 secondes, puis dans de l'eau dH_2O pendant 2 minutes et dans un tampon anode II (25mM Tris pH 10,4, 10% EtOH) jusqu'à l'assemblage du transfert. Quatre carrés de papier Whatman sont placés dans du tampon cathode et un carré de papier Whatman est placé dans du tampon anode I (300 mM Tris pH 10,4, 10% EtOH). Les différents papiers, le gel et la membrane sont placés comme présentés dans la **figure 62** dans un système Trans-blot Turbo (Bio-Rad) pendant 40 minutes à 60mA. La membrane alors saturée de protéines est placée dans de l'éthanol 96% pendant quelques secondes puis séchée.

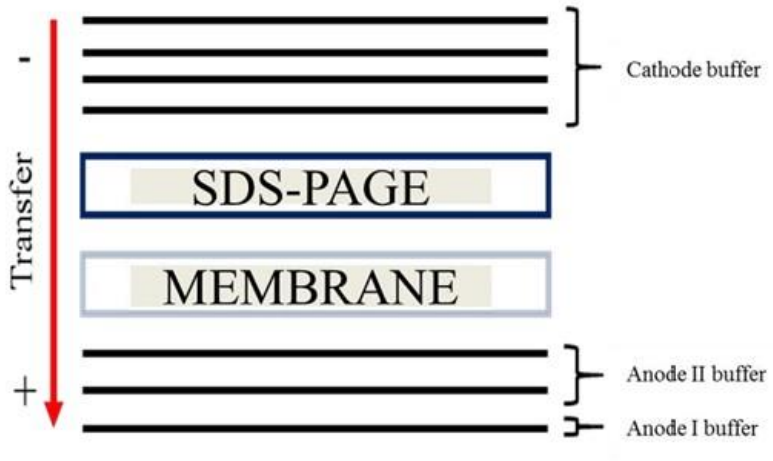


Figure 62 : Schéma représentatif du transfert de protéine sur la membrane PVDF.

Les protéines sont ensuite détectées par immunodétection. Pour cela, la membrane est immergée dans une solution de lait 4% dans du TBS (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH7,6) pendant 30 minutes. Puis après des lavages au TBS, la membrane est incubée dans la solution TBS Lait 0,5% contenant les anticorps monoclonaux spécifiques anti-histidine couplée à la peroxydase (Goat anti-His Antibody HRP Conjugated, Sigma), dilués 4000 fois, pendant 1h30. La membrane est ensuite lavée par immersion dans du TBS Tween 20 0,05 % pendant 10 minutes à trois reprises. La révélation des protéines se fait par ajout de solution DAB (diaminobenzidine) selon les recommandations du fournisseur. (Thermo Fischer). La peroxydase couplée à l'anticorps secondaire convertit le DAB en un précipité insoluble de couleur brune au niveau des sites où l'anticorps secondaire est lié, ce qui révèle visuellement la présence et la localisation de la protéine d'intérêt.

II.4. Caractérisation biochimique

L'activité de PpPG2, PpPG3 et PpPG4 a été testée par méthode DNS (3,5-dinitrosalicylique acid) (Q. Li et al., 2015) sur différents substrats : l'acide polygalacturonique (PGA, 81325, Sigma), des pectines de betteraves sucrières méthylés (degré de méthylation 42%, DM42) et acétylés (degré d'acétylation 31%, DA31) et des rhamnogalacturonanes de type I (RG-I, P-RHAM1, Megazyme). Ce test repose sur la quantification des sucres réducteurs, ou des extrémités réductrices des chaînes de substrats pectiques, produits par le clivage des liaisons des substrats ou de l'acide polygalacturonique par les polygalacturonases, ce qui génère une extrémité réductrice. En présence d'extrémités réductrices et après chauffage, le DNS est réduit en 3-amino-5-nitrosalicylique, produisant une couleur orange à rouge, dont l'intensité est mesurée par spectrophotométrie à 540nm. La quantification de l'activité enzymatique est réalisée grâce à une gamme étalon de concentrations croissantes en acide galacturonique (0, 24, 48, 120, 240, 360 et 480 nmol) dont chaque DO sera mesurée en duplicat. Les échantillons sont préparés en triplicat : 4 µg d'enzyme en présence de substrat 1% dans le tampon d'activité (NaOAc 50 mM, pH 5.75). En regard, les échantillons contrôles contiennent les enzymes dénaturées (15 minutes à 98°C). La digestion du substrat par les enzymes se fait selon les conditions choisies. Dans le cas d'un test d'activité polygalacturonase classique pour les PpPG2, 3 et 4, la digestion se fait à 40°C pendant 1 heure.

Suite à la digestion, 150 µL de DNS sont ajoutés dans les tubes qui sont chauffés à 95°C pendant 10 minutes pour la réaction. Enfin 100 µL de chaque échantillon ou point de gamme étalon sont transférés dans une plaque 96 puits avant la lecture de l'absorbance. Les résultats de l'activité des polygalacturonases sont exprimés en picomoles de GalA.min^{-1}.µg^{-1} de protéine.

II.5. Identification des OGs

L'analyse des oligogalacturonides (OGs) produits par la digestion des substrats pectiques par les polygalacturonases a été réalisée comme décrit dans Voxeur et al. (Voxeur et al., 2019). Cette analyse permet de déterminer le mode d'action des polygalacturonases. Les OGs ont été produits par la digestion d'acide polygalacturonique (PGA) et de pectine à 35% de méthylation (DM35) à 0,4% de concentration finale, par les protéines PpPG2, PpPG3 et PpPG4, pendant 2h et 16h (O/N), à 40°C, dans un tampon d'acétate d'ammonium NH_4OAc 50mM pH 5,75. La digestion est stoppée et les pectines non digérées précipitées par ajout d'un volume d'éthanol 100% suivi d'une centrifugation à 6000 rpm (5000 rcf) pendant 5 minutes 200 µL d'OGs contenus dans le surnagent sont récupérés et évaporés sous vide puis resuspendus dans de l'eau ultrapure mQ avant d'être analysé par méthode LC-MS/MS. Les OGs sont d'abord séparés par chromatographie de taille pour les discriminer selon leur degré de polymérisation (DP), puis les fractions sont analysées par spectrométrie de masse (MS) pour identifier les modifications méthyles et acétyles. La méthode MS/MS permet de fragmenter les OGs et de confirmer leurs structures.

La première étape (LC) est une chromatographie d'exclusion stérique ultra-performante (UP-SEC) consistant à la séparation chromatographique, réalisée par un système ACQUITY UPLC H-Class (Waters Corporation, Milford, MA, USA), à l'aide d'une colonne ACQUITY UPLC Protein BEH SEC (125 Å, 1,7 µm, 4,6 mm x 300 mm). L'élution a été réalisée dans du formiate d'ammonium NH_4HCO_2 50 mM + 1% d'acide formique à un débit de 400 µL/min et une température de 40°C. Le volume d'injection a été fixée à 2 µL.

La seconde étape (MS/MS) est une spectrométrie de masse à haute résolution avec ionisation par électrospray (ESI-HRMS). La détection MS a été réalisée à l'aide de l'instrument SYNAPT G2-Si couplé au système ACQUITY UPLC H-Class. La source ESI fonctionnait en mode d'ionisation négative avec une tension capillaire de -2,5 kV et les conditions suivantes : tension du cône, 120 V ; décalage de la source, 20 V ; température de la source, 120 °C ; température du gaz de désolvatation, 450 °C ; débit du gaz de désolvatation, 800 $L.h^{-1}$ et débit du gaz du cône, 50 $L.h^{-1}$. De l'azote (> 99,5 %) a été utilisé comme gaz de désolvatation. L'étalonnage de masse a été effectué à l'aide d'une solution de formiate de sodium (10 mM NaOH dans de l'isopropanol/eau/acide formique aux volumes respectifs 49,9:49,9:0,2) et une correction de masse verrouillée a été appliquée pour obtenir des mesures de masse précises à l'aide de l'ion $[M-H]^-$ (m/z 554,2615) obtenu à partir d'une solution de Leu-enképhaline (1 ng. μL^{-1} dans H2O/CH3CN/acide formique aux volumes respectifs 50:49,9:0,1). La plage de balayage était de m/z 50-2500 à 0,25 s/balayage. Tous les spectres ont été enregistrés en mode centroïde. Enfin, l'acquisition des données a été réalisée à l'aide du logiciel MassLynx (V4.1, Waters).

La comparaison des profils d'OGs, l'intensité des pics et leurs DPs permet de déterminer la spécificité et la processivité des polygalacturonases (Safran et al., 2021 ; Voxeur et al., 2019).

Tableau 3 : Composition des milieux de culture de *Physcomitrium patens*.

Pour 1 L		Milieu
Calcium nitrate tetrahydrate ($Ca(NO_3)$, $4H_2O$)	**0,8 g**	BCD ou BCDAT
Magnésium sulfate heptahydrate ($MgSO_4$, $7H_2O$)	**0,25 g**	BCD ou BCDAT
Sulfate de fer heptahydrate ($FeSO_4$, $7H_2O$)	**12,5 mg**	BCD ou BCDAT
Stock de microélément 1000X	**1 mL**	BCD ou BCDAT
Tampon phosphate pH7 1000X	**1 mL**	BCD ou BCDAT
Ammonium tartrate ($(NH_4)2C_4H_4O_6$)	**0,5 g**	**BCDAT uniquement**
Agar	**7,2 g**	BCD ou BCDAT

CHAPITRE III : ETUDES FONCTIONNELLES

III.1. Matériel végétal

Les études fonctionnelles ont été réalisées sur un clone sauvage de *Physcomitrium patens* de l'écotype Grandsen. Ce clone a été maintenu en phases de développement par des broyages de tissu protonéma et multiplications hebdomadaires en routine (D. Cove, 2005). Il a été utilisé pour les expériences de phénotypages sur le PP60, ainsi que pour la production des différents mutants. De plus, il a été maintenu en cultures de routine aux mêmes temps que les mutants afin de produire des données de comparaisons en tant que tissu sauvage.

III.2. Méthode de culture

Le matériel végétal est maintenu en chambre de culture à 24°C en cycle jour long, soit 16h lumière et 8h obscurité, en lumière blanche entre 5 et 20 W/m² et à une hygrométrie de 60% d'humidité relative (D. J. Cove et al., 2009). Les tissus sont mis à proliférer sur du milieu BCDAT (Sels de base, Ca^{2+}, Dextrose, Agar, Ammonium tartrate) qui est supplémenté en ammonium tartrate, composé comme suit : Pour 1 litre, 0,8 g de calcium nitrate tetrahydrate ($Ca(NO_3)$, $4H_2O$), 0,25 g de magnésium sulfate heptahydrate ($MgSO_4$, $7H_2O$), 12,5 mg de sulfate de fer heptahydrate ($FeSO_4$, $7H_2O$), 1 mL de stock de microélément 1000X, 1 mL de tampon phosphate pH7 1000X, 0,5 g d'ammonium tartrate ($(NH_4)2C_4H_4O_6$) et 7,2 g d'agar. Le stock de microélément est composé, pour 100 mL, de 5,5 mg de sulfate de cuivre pentahydrate ($CuSO_4$, $5H_2O$), 5,5 mg de sulfate de zinc heptahydrate ($ZnSO_4$, $7H_2O$), 61,4 mg d'acide borique (H_3BO_3), 38,9 mg de chlorure de manganèse tetrahydrate ($MnCl_2$, $4H_2O$), 5,5 mg de chlorure de cobalt hexahydrate ($CoCl_2$, $6H_2O$), 2,8 mg d'iodure de potassium (KI) et 2,5 mg de molybdate de sodium dihydrate (Na_2MoO_4, $2H_2O$). Le tampon phosphate 1000X est composé, pour 100 mL, de 25 g de potassium phosphate monobasique (KH_2PO_4) ajusté à pH 7. Le milieu est coulé en conditions stériles dans des boites de Pétri de 90mm de diamètre, puis une fois polymérisé, un film de cellophane stérile est déposé sur le milieu solide pour faciliter la récupération de tissu végétal. En routine, les tissus de *P. patens* sont maintenus en croissance par régénération. Tous les 7 jours, un morceau de tissu protonémal est prélevé de la boite, puis est broyé au broyeur à bille, dans un tube 2 mL contenant 1 mL d'eau stérile et deux billes de broyage. Le broyat est alors déposé de manière homogène sur une nouvelle boite de pétri contenant du milieu BCDAT et un film cellophane.

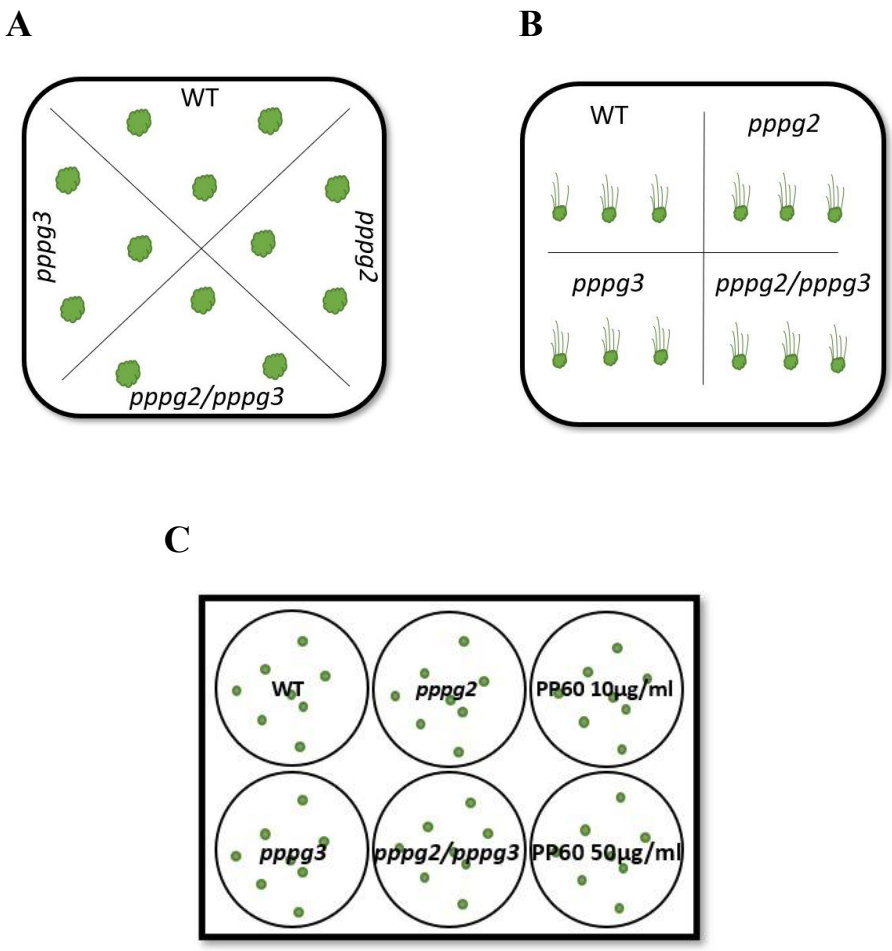


Figure 63 : Plans de plaque de phénotypage de *Physcomitrium patens*.

Les cultures pour le phénotypage des aires (A) se fait sur milieu solide BCD ou BCDAT en position horizontale ; celles des caulonémas agravitropiques (B) se fait sur milieu solide BCD ou BCDAT à la verticale et à l'obscurité ; et celles des protoplastes (C) se fait dans du milieu liquide PRM. La position des boites dans la chambre de culture est régulièrement randomisée.

III.3. Méthodes de phénotypage

Le phénotypage se fait sur milieux BCDAT ou BCD, ce dernier étant plus communément utilisé. Le milieu BCD est composé comme suit : Pour 1 litre, 0,8 g de calcium nitrate tetrahydrate ($Ca(NO_3)$, $4H_2O$), 0,25 g de magnésium sulfate heptahydrate ($MgSO_4$, $7H_2O$), 12,5 mg de sulfate de fer heptahydrate ($FeSO_4$, $7H_2O$), 1 mL de stock de microélément 1000X, 1 mL de tampon phosphate pH7 1000X. Pour le phénotypage des aires protonémas de *P. patens*, des boites de pétri carrées de 120 mm x 120 mm sont utilisées. Des morceaux de tissus protonémas âgés de 7 jours sont prélevés depuis les boîtes de cultures BCDAT, puis déposés selon un plan de plaque optimisant l'emplacement des différents isolats selon l'expérience, comme présenté dans la **figure 63**. Ce dispositif constitue le point de départ des expérimentations, appelé J0. Dans le cas du phénotypage en conditions PP60, le milieu est supplémenté avec 10 ou 50µg/mL de PP60 dilué dans de l'eau et filtré en conditions stérile avant sa polymérisation. Le développement des clones se fait en chambre de culture à 24°C.

III.3.1. Phénotypage des croissances bi- et tri-dimensionnelles

Le phénotypage des aires de protonémas se fait en conditions normales de la chambre de culture. Les boites sont randomisées dans la chambre de culture tous les 3 à 7 jours. Tous les 7 jours, à compter de J0, les boites sont photographiées pour un suivi de croissance. Une règle est utilisée pour servir d'échelle sur toutes les photographies. Les différentes aires sont mesurées à l'aide du logiciel ImageJ, de cette manière :

1- Détermination de l'échelle : Outils « Straight line » → Prendre 10 mm de la règle. Puis onglet « Analyze » → « Set scale » → « Known distance » = **10** et « Unit of length » = **mm**.
2- Transformation de l'image : Onglet « Image » → « Type » → « 8-bit ».
3- Formation du seuil : Onglet « Image » → « Adjust » → « Threshold ». Puis sélectionner la valeur de seuil permettant de visualiser les aires. Faire un seuil homogène pour toutes les photos et boites.
4- Mesurer les aires manuellement : Outils « Wand Tool ». Puis sélectionner l'isolat dont on veut mesurer l'aire. Puis faire « Ctrl + M » pour mesurer. L'aire est affichée en première colonne du tableau, juste après le numéro de la mesure.
5- Ou mesurer les aires automatiquement : Onglet « Analyze » → « Analyze Particles ». Puis sélectionner un échantillon d'aires à analyser en mm^2.

Les mesures d'aires sont regroupées dans le tableau de mesure, le numéro de mesure correspondant au numéro présenté sur l'image. Les aires sont ainsi répertoriées et suivies pour chaque isolat en cours de phénotypage, à partir de J0, jusqu'à J+28.

Pour le phénotypage du nombre de gamétophore, tous les 7 jours, les isolats sont observés à la loupe binoculaire, puis pour chacun d'entre eux, les gamétophores sont dénombrés. Le nombre de gamétophores d'un isolat est rapporté à l'aire de celui-ci afin de déterminer la densité de gamétophores.

III.3.2. Phénotypage des caulonémas agravitropiques

Le phénotypage des caulonémas agravitropiques se fait également dans des boites de pétri carrées, à 24°C, sur milieux BCDAT, BCD ou BCD supplémenté en PP60. Après le dépôt des isolats sur les boites, celles-ci sont mises à croître à l'horizontale en cycle jours longs entre 10 et 12 jours. Elles sont alors placées à l'obscurité en croissance verticale pendant 7 ou 14 jours. A la fin de la culture à l'obscurité, les différents isolats sont photographiés à l'aide d'un macroscope afin d'avoir une bonne définition des caulonémas. Pour chacun des isolats, le nombre de caulonémas est compté, ainsi que le nombre d'embranchements. Enfin, des caulonémas sont sélectionnés pour photographier leurs cellules et les mesurer en prenant en compte l'échelle du grossissement du macroscope. L'ensemble des photographies du même caulonéma est regroupé en une image mosaïque grâce au plugins MosaicJ et les cellules mesurées grâce à l'outils « Straight line » d'ImageJ, de la première cellule, au sommet du caulonémas, à la dernière, proche du centre de l'isolat. Il est nécessaire d'indiquer l'échelle de pixel/µm du magnificateur du macroscope dans ImageJ pour chaque image avant les mesures.

III.3.3. Phénotypage des protoplastes

Le phénotypage des protoplastes se fait en milieu liquide PRM (Protoplast Regeneration Medium) dans des plaques 6 puits, chacun contenant 5 mL de milieu de culture. Le milieu PRM correspond au milieu BCDAT additionné de Mannitol 8,5%, ce qui permet le maintien de la pression osmotique des protoplastes. La culture se fait également à 24°C, en revanche, les plaques de protoplastes sont placées sous agitation douce sur une plaque rotative afin de permettre l'oxygénation continue du milieu liquide, ainsi que la suspension des protoplastes en régénération. Il peut être recommandé de rajouter 1 mL de milieu PRM un petit peu chaque jour pour cause d'évaporation du milieu liquide, risquant la cristallisation du mannitol. Les tissus formés à partir des protoplastes sont appelés régénérants. Ils sont photographiés 7 jours après la mise en culture des protoplastes à l'aide d'un macroscope. A partir de ces photos sont comptés le nombre de cellules, le nombre de branchement et la mesure des branches des régénérants est réalisée grâce à ImageJ.

III.3.4. Immunohistochimie

Les tissus observés par immunofluorescence sont des tissus de protonémas de 7j déposés dans une plaque 12 puits (ThermoScientific, 150200), dans 2 mL de milieu BCD liquide supplémenté ou non, en PP60 50 µg/mL. La méthode utilisée est communément utilisée dans l'observation de tissus végétaux par immunofluorescence (Shimamura, 2015). La fixation est réalisée dans du formaldéhyde 4% (dans PBS 1X pH7,4), sous sorbonne et sous agitation douce à 4°C toute une nuit. Les échantillons sont ensuite lavés à trois reprises pendant 10 minutes par du PBS 1X pH7,4, puis mis à incuber dans une solution de PBS 1X-glycine 0,1 M pendant 10 minutes, puis immergés dans un tampon à 4 % d'albumine sérique bovine (Sigma Aldrich, A9418) dans 1X PBS à 4 °C pendant 30 minutes sous agitation douce. Les anticorps primaires monoclonaux, qui sont LM6 (Anti-1,5-α-L-Arabinan), LM11 (Anti-heteroxylan), LM19 (Anti-homogalacturonan demethylesterified) et LM20 (Anti-homogalacturonan methylesterified), sont été dilués à 1/5 dans la solution précédente et les échantillons y sont incubés pendant 2 heures à 4 °C sous agitation douce. Après 3 lavages dans du PBS 1X pendant 10 minutes, l'anticorps secondaire (Alexa Fluor 488, Invitrogen, A11006) dilué à 1/50 dans le tampon est ajouté et l'incubation réalisée sous agitation douce à 4°C pendant une heure. Les échantillons, sont placés entre lames et lamelles dans du glycérol à 80 % avant observation après trois lavages de 10 min dans du PBS 1X sous agitation douce.

Celle-ci se fait par microscopie confocale (Leica Stellaris 5). L'auto-fluorescence des chloroplastes est présentée en rouge, tandis que la fluorescence du Alexa Fluor 488 est présentée en vert, révélant la présence des épitopes correspondant aux anticorps primaires utilisés. L'anticorps secondaire (Alexa Fluor 488) a été excité par une ligne laser blanche à 498 nm. Le signal a été détecté par un détecteur Power HyD S dans une plage de 503 à 579 nm en utilisant les mêmes paramètres (intensité, gain, décalage, résolution) afin de permettre des mesures quantitatives. Les observations ont été réalisées à l'aide d'un objectif HC PL APO CS2 20x/0,75 IMM ou d'un objectif HC PL APO CS2 40x/1,10 WATER. L'acquisition des images a été effectuée à l'aide du logiciel LAS X 4.7.0.28176 (Leica Microsystems) et l'analyse des images a été réalisée à l'aide du logiciel ImageJ 1.53e.

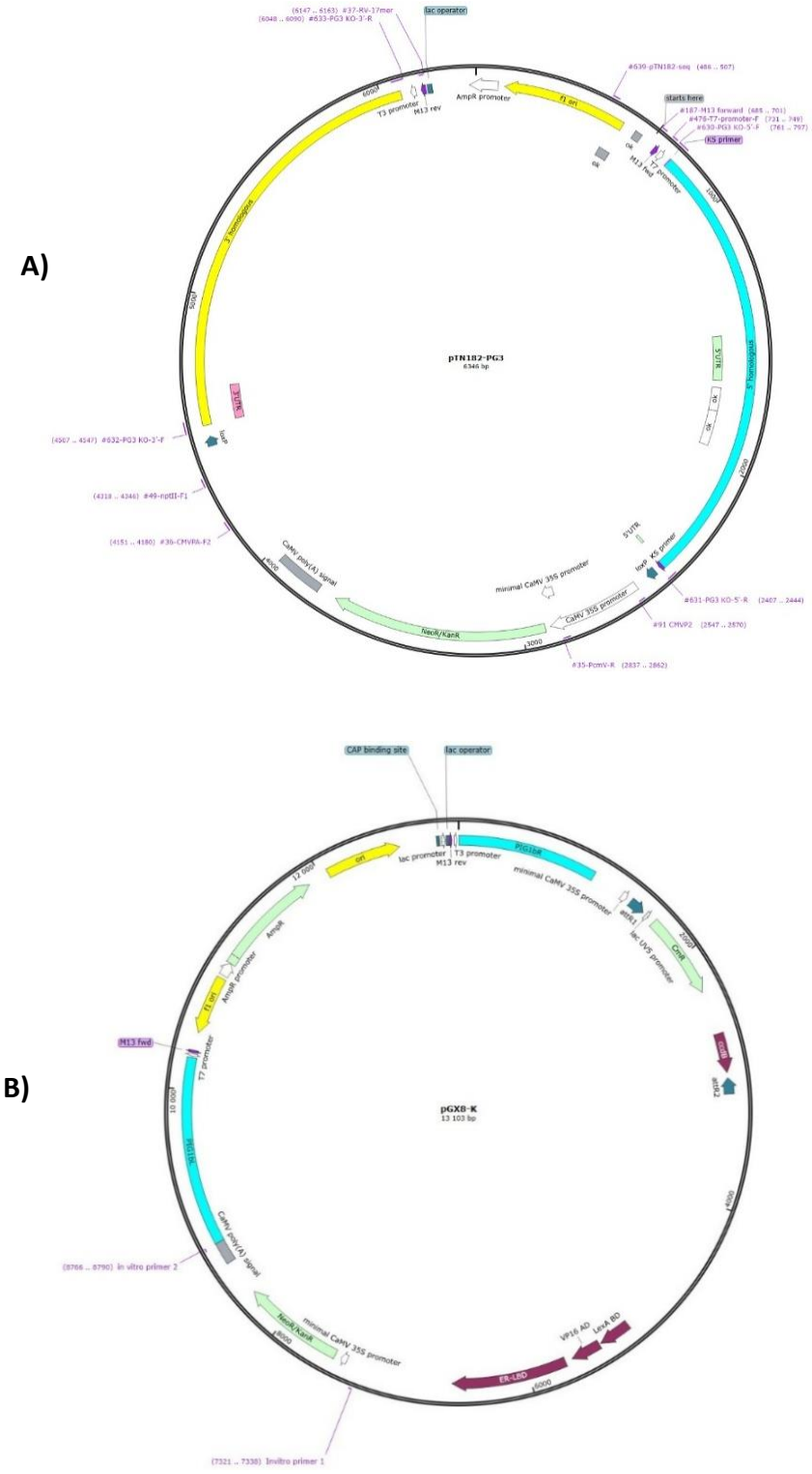


Figure 64 : Schéma des constructions plasmidiques utilisées pour les transformations de *Physcomitrium patens*.

A) Schéma de pTN182-PG3 utilisé pour la génération de mutants de délétion *pppg3* par recombinaison homologue. **B)** Schéma de pGX8K utilisé pour génération de mutants surexprimant un gène cible de façon inductible par recombinaison homologue.

III.4. Mutants *Physcomitrium patens*

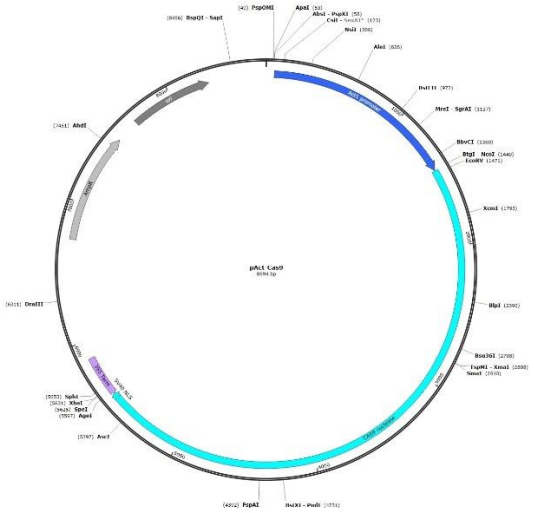
III.4.1. Préparation des plasmides

Trois types de mutants ont été produits et utilisés. Les mutants de délétion *pppg2* et *pppg3* qui ont été obtenus par remplacement des gènes respectifs par recombinaison homologue dans des protoplastes de *P. patens* sauvage. Le double mutant knock-out *pppg2/pppg3* a été obtenu par remplacement du gène *PpPG3* dans des protoplastes du mutant *pppg2*. La recombinaison homologue fonctionne, en utilisant des constructions plasmides pTN, comme présenté en **figure 64 A**, permettant la recombinaison de séquences homologues, dans notre cas, les régions flanquantes 5' et 3' du gène cible, d'un gène d'intérêt, dans notre cas, un gène de résistance à l'antibiotique kanamycine permettant la sélection des mutants obtenus (Zhu, 2021).

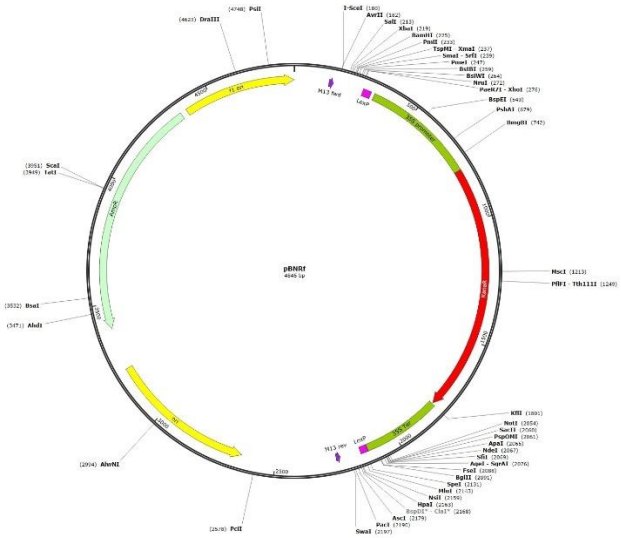
Les mutants de surexpression inductibles PPPG4 iOX ont été obtenus par recombinaison homologue dans des protoplastes de *P. patens* sauvage. Pour cette transformation, le vecteur pGX8K, présenté en **figure 64 B**, a été utilisé, permettant l'expression du gène d'intérêt en présence de β-estradiol. Il contient le système inductible XVE correspond à la séquence d'un activateur transcriptionnel chimérique constitué du domaine de liaison à l'ADN du répresseur bactérien LexA (LexA BD), du domaine d'activation transcriptionnelle de la protéine VP16 du virus de l'Herpes (VP16 AD) et la région régulatrice du récepteur estrogénique humain (ER-LBD, Estrogen Receptor Ligand Binding Domain). En présence de β-estradiol, la protéine XVE se lie aux opérateurs LexA situés devant le gène d'intérêt, permettant ainsi sa transcription (Kubo et al., 2013).

Enfin, les mutants de délétion multiples, comme le clone #138, ont été obtenus par transformation de protoplastes sauvages par la méthode CRISPR-Cas9. Cette méthode repose sur l'utilisation d'un mix de plasmides qui sont, pAct-Cas9, pBNRf et des plasmides contenant les ARN guides (sgRNA), tous présentés dans la **figure 65 A**, **B** et **C** respectivement. Le principe consiste en la transfection et l'expression de plasmides transitoires dans le protoplaste de *Physcomitrium patens*. La protéine Cas9, dont la séquence codante est présente sur le plasmide pAct-Cas9, est alors produite dans la cellule, puis les sgRNA guident Cas9 vers le gène cible, où elle le coupera. La cellule réparera la coupure, générant des mutations ou délétions.

A)



B)



C)

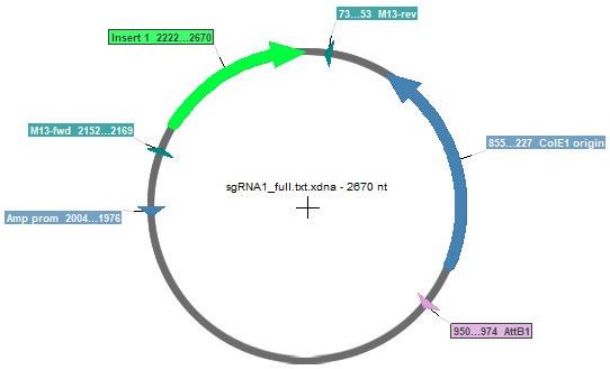


Figure 65 : Schéma des constructions plasmidiques utilisés pour les transformations de *Physcomitrium patens*.

A) Schéma de pAct-Cas9. **B)** Schéma de pBNRf. **C)** Schéma d'un plasmide sgRNA.

Le plasmide pBNRf quant à lui permet l'expression transitoire d'un gène de résistance à un antibiotique, permettant la sélection des protoplastes transfectés et l'élimination des non-transfectés (Charlot, 2022).

Pour obtenir une quantité suffisante de plasmide pour les transformations de *Physcomitrium*, une transformation de *Escherichia coli* est d'abord nécessaire pour multiplier les plasmides. Pour cela, 2 µL de vecteurs sont mélangés à 45 µL d'*E. coli* compétentes TOP10, puis le mélange est mis à incuber sur glace pendant 20 minutes. Un choc thermique à 42°C est appliqué pendant 40 secondes avant d'être de nouveau incubé sur glace pendant 5 minutes. 250 µL de SOC (2 % (p/v) de tryptone, 0,5 % (p/v) d'extrait de levure, 0,48 % (p/v) de MgSO4, 0,186 % (p/v) de KCl, 0,3603 % (p/v) de dextrose) sont ajoutés avant incubation à 37 °C, sous agitation de 200 rpm, pendant 90 minutes. Puis le volume total est étalé sur deux boites de gélose LB (4 % (p/v) supplémenté en Ampicilline (100 µg/mL), en accord avec le gène de sélection procaryote présent sur les différents plasmides. Les colonies d'*E. coli* transformées apparaissent après 24 heures d'incubation à 37 °C. Pour chaque construction, des colonies sont piquées et transférées dans des tubes contenant 50 mL de LB liquide supplémenté en ampicilline, puis mis à incuber pendant 24 heures à 37°C et 200 rpm.

L'extraction et la purification des plasmides se fait en utilisant le kit PureYield™ Plasmid Midiprem System, selon les recommandations du fournisseur. Les cultures liquides de *E. coli* sont d'abord centrifugées à 6000 rpm (5000 rcf) pendant 10 minutes. Les surnageants sont jetés et les culots de bactéries sont resuspendus dans 3 mL de solution de resuspension. Puis 3 mL de solution de lyse cellulaire sont ajoutés et mélangés, puis mis à incuber à température ambiante pendant 3 minutes, avant d'être neutralisés par 5 mL de solution de neutralisation, et mélangés. Le lysat est mis à centrifuger pendant 15 minutes à 10000 rpm (15000 rcf). Pour chaque construction, donc chaque lysat, une colonne PureYield™ Clearing Column est placée au sommet d'une colonne PureYield™ Binding Column, elle-même placée sur un collecteur à vide. Le surnageant est délicatement déposé en haut, puis le vide est effectué pour permettre le transfert de liquide au travers des colonnes. La colonne « Clearing » est retirée, puis, sous vide, 5 mL de solution de lavage Endotoxin Removal Wash sont déposés au sommet la colonne « Binding ». Enfin, toujours sous vide 20 mL de solution de lavage Column Wash sont déposés sur la colonne. La membrane (contenant les plasmides) de la Binding Column est mise à sécher.

Elle est ensuite placée dans un tube de 50 mL et 600 µL d'eau Nuclease Free sont déposés sur la membrane, puis mis à centrifuger à 4000 rpm pendant 5 minutes. Le filtrat est alors récupéré, la quantité de plasmide est mesurée par spectrophotométrie au NanoDrop One.

Dans le cas des transformations par recombinaison homologue, une linéarisation est nécessaire. Elle s'effectue en mélangeant 60 µL d'ADN plasmidique, à 50 µg/mL, 40 µL de tampon 10X de restriction (exemple Cutsmart), 4 µL d'enzyme de restriction double cutter, donc qui coupent à deux endroits dans le vecteur, telles que BssHI pour pTN-PG2 et pTN-PG3, et Sbf-I pour pGX8K-PG4, et de l'eau stérile jusqu'à un volume total de 400 µL. La digestion par les enzymes de restrictions se fait à 37°C, pour ces deux enzymes, toute la nuit. Le lendemain, les ADN linéarisés sont purifiés par ajout de 200 µL de phénol-chloroforme, puis vortexé quelques secondes avant d'être centrifugé à 14000 rpm pendant 5 minutes. 400 µL de phase aqueuse contenant l'ADN sont prélevés et transférés dans un nouveau tube. La précipitation de l'ADN est réalisée par ajout de 1 mL d'éthanol 100% EtOH et 20 µL de NaCl 5M. Le mélange est mis à incuber à -20°C pendant 1 heure et 30 minutes, puis centrifugé à 14000 rpm pendant 15 minutes. Le surnageant est retiré puis 1 mL d'éthanol 70% EtOH est ajouté puis remis à centrifuger à 14000 rpm pendant 5 minutes. Le surnageant est retiré, puis le culot d'ADN est mis à sécher sous hotte en conditions stériles, avant d'être resuspendu dans 60 µL de tampon TE. 1 µL d'ADN linéarisé est mis à migrer dans un gel d'agarose pour vérifier sa qualité, ainsi que la taille des bandes linéarisées. Pour chaque transformation, 20 µg de plasmide linéarisé, dans un volume de 25 µL, sont utilisés par transformation.

Dans le cas des transformations par méthode CRISPR-Cas9, les différents vecteurs gRNA, pBNRf et pAct-Cas9 sont mélangés, avec une quantité équivalente de chaque vecteur pour une concentration maximale de 1 µg/µL et un volume maximum de 30 µL par transformation. Dans le cas de la transformation effectuée, nous avons utilisé un mix de 4µg de pAct-Cas9, 4µg de pBNRf, 4µg de sgRNA#1 (spécifique Pp3c1_12100, PpPG1 et Pp3c9_20390, PpPG3), 4µg de sgRNA#2 (spécifique Pp3c5_16500, PpPG6) et 4 µg de sgRNA#8 (spécifique Pp3c19_14240, PpPG2), pour un total de 20µg d'ADN dans 30 µL.

III.4.2. Obtention des mutants

Toutes les méthodes de transformation de *Physcomitrium patens* se font par transfection de protoplastes. Les protoplastes sont préparés à partir de tissu frais et à l'aide d'un cocktail d'enzymes permettant de dégrader la paroi. D'abord, du tissu protonémal âgé de 7 jours est récolté puis déposé dans un mélange de 400 µL de Driselase 2%, 400 µL de Cellulase 1% et 400 µL de Macerozyme 0,05%, le tout dissout dans du mannitol 8,5 % stérile et filtré à 0,22 µm. Un tube est nécessaire par construction, donc par vecteur, en plus d'un tube pour le témoin non transformé. Les tissus sont laissés à digérer à température ambiante, sous agitation douce, pendant 1h30. Les protoplastes produits sont récupérés à travers des filtres de 50 µm dans des tubes 2 mL. Les filtres sont lavés avec 500 µL de Mannitol 8,5 % et $CaCl_2$ 10 mM pour récupérer les protoplastes restants du tissu digéré. Les enzymes sont ensuite retirées par une succession de centrifugation à 1000 rpm (100 rcf) de 2 minutes, où le surnageant est doucement retiré et où 750 µL de mannitol 8,5 % + $CaCl_2$ 10 mM sont délicatement ajoutés au culot de protoplastes, doucement resuspendu à la main. Cette opération de lavage est effectuée trois fois en tout. Une fois le culot lavé de toute trace d'enzymes, il est resuspendu délicatement dans 300 µL de solution MMM (Mannitol 8,5 % + MES 1% + 15 mM $MgCl_2.6H_2O$), puis laissé à température ambiante pendant 10 minutes. A partir de cet instant, les protoplastes sont prêts à être utilisés. Dans notre cas, nous utilisons les protoplastes pour réaliser des transformations dans le but d'obtenir des mutants, mais également pour réaliser le phénotypage des protoplastes régénérants.

Dans le cas de transformation par recombinaison homologue pour les mutants *pppg2*, *pppg3*, *pppg2/pppg3* et PPPG4 iOX, les protoplastes sont ensuite transférés dans des tubes de culture 14 mL à l'aide d'une pipette 1 mL en utilisant des cônes stériles biseautés. 2 µL d'ADN de sperme de saumon, à 1 mg/mL, est déposé dans les tubes afin de saturer les potentielles DNAses présentes avec de l'ADN inerte à la transformation. Puis 25 µL des constructions linéarisées, soit entre 10 et 15µg d'ADN, sont déposés dans les tubes correspondants puis incubés 10 minutes à température ambiante. Ensuite, 300 µL de PEG 40% (PolyEthylene Glycol MW 6000) sont ajoutés dans les tubes, placés à 45°C dans un bain marie pendant 5 minutes, puis placés ensuite en bain marie de refroidissement à 20°C pendant 10 minutes. Du mannitol 8,5% est ajouté progressivement jusqu'à 5 mL, puis les protoplastes sont culotés par centrifugation à 1000 rpm pendant deux minutes. Enfin, 8 mL de milieu PRM/T (PRM Top layer ; PRM + Agar 4%) sont ajoutés dans chaque tube, puis versés sur des boites de pétri contenant du milieu PRM/B (PRM Bottom layer ; PRM + Agar 7%) cellophanés avant la polymérisation.

Les boites de pétri sont légèrement agitées pour étaler le PRM/T et homogénéiser la densité du gel sur la cellophane. Les protoplastes sont mis à régénérer dans une chambre de culture pendant 7 jours. Une feuille de papier recouvre les boites le premier jour afin réduire la perte de protoplastes du fait de leur sensibilité à la lumière. Après 7 jours de régénération, les protoplastes sont transférés sur un milieu BCDAT supplémenté en antibiotique correspondant à la construction transfectée (zéocine ou hygromycine) à 40 µg/mL pour effectuer une sélection des régénérants durant 7 jours. Enfin, les régénérants ayant résisté à la sélection sur antibiotique subissent une dernière sélection dans un second milieu BCDAT + antibiotique 40 µg/mL, où les clones restant sont repiqués et numérotés. Les clones résistants à cette seconde sélection sont génotypés pour confirmer la présence du gène recombiné.

Dans le cas de la transformation CRISPR-Cas9, une méthode alternative de transformation de *Physcomitrium patens* a été utilisée. Dans celle-ci, nous ajoutons une étape de dénombrement de protoplastes sains avant l'étape de suspension dans le MMM. Une goutte de solution mannitol 8,5% + CaCl2 10 mM, contenant les protoplastes produits et filtrés, est prélevée et déposée sur cellule de Malassez. Le but étant de déterminer le volume de protoplastes à prélever pour avoir la quantité optimale de protoplastes, soit entre 3,6 et 4,8 x 10^5 par transformations. La transformation des protoplastes avec le mélange de vecteurs (gRNA, pBNRf et pAct-Cas9), est réalisée comme précédemment.

Par ailleurs, une alternative au PRM/T est utilisée lors des dernières étapes de la transformation. Les protoplastes, après le traitement au PEG (incubation à 45°C et étape de refroidissement), sont resuspendus dans un volume de milieu PRM + $CaCl_2$ 10mM. Suite à cela est ajouté un volume d'alginate (1,5% Alginate + 8,5% Mannitol), puis le mélange est déposé sur les boites de PRM/B cellophanés où il se polymérisera rapidement.

Tableau 4 : Composition du mix de PCR pour le génotypage des mutants, par tube.

*F = Forward. **R = Reverse.

Produits	Volume (µL)
Q5 HF Buffer	4
Amorce F*	1
Amorce R**	1
dNTP (10nM)	0,5
Taq Polymerase Q5 HF	0,25
H_2O	Jusqu'à 19 µL
ADN génomique	1 µL

Tableau 5 : Programme et conditions de PCR utilisés pour le génotypage des mutants avec la Taq polymérase Q5 HF.

Programme (Température et durée)		
Dénaturation initiale	98°C - 30 sec	
Dénaturation	98°C - 10 sec	x 35
Hybridation	55°C - 30 sec	
Elongation	72°C - 1 min 30 sec	
Elongation finale	72°C - 2 min	

III.4.3. Génotypage des mutants *pppg2*, *pppg3* et *pppg2/pppg3*

Afin de confirmer la recombinaison, les mutants ont été génotypés. L'extraction d'ADN génomique se fait après broyage au pilon de tissus de *Physcomitrium patens* dans des tubes 1,5 mL contenant. 400 µL de tampon Edwards (Tris-HCl 200 mM pH 7,5, EDTA 25 mM, NaCl 250 mM, 0,5% SDS). Après une agitation rapide par vortex, le broyat est centrifugé 5 minutes à 14 000 rpm à température ambiante. 300 µL de surnageant est transféré dans un nouveau tube, auquel 300 µL d'isopropanol (alcool isopropylique). Après avoir vortexé, le tube est mis à centrifuger 15 minutes à 14 000 rpm. Le surnageant est retiré pour ne conserver que le culot contenant l'ADN génomique extrait, qui sera ensuite lavé avec 200 µL d'éthanol 70%, recentrifugé 5 minutes à 14 000 rpm. L'Ethanol est ensuite vidé, puis le culot est mis à sécher avant d'être resuspendu dans 60 µL de tampon TE (Tris HCl 10mM, EDTA 1mM pH8) et conservé à 4°C.

Le génotypage des clones #53 et #83, obtenus après la transformation par recombinaison homologue de *pppg2*, s'est fait par PCR avec les amorces adéquates #737 et PcmV-R pour l'extrémité 5' ; et #738 et nptII-F1 pour l'extrémité 3'. Les amorces #737 et #738 ont été dessinées pour se localiser dans le génome de *Physcomitrium patens*, à proximité directe avec le gène *PpPG2* du côté 5' et 3' respectivement. Tandis que les amorces PcmV-R et nptII-F1 ont été dessinés pour être spécifiques de sites localisés aux extrémités 5' et 3', respectivement, de la construction du gène recombiné. La région ciblée a été amplifiée avec Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (NEB, réf. M0491). La composition de la solution de PCR est décrite dans le **tableau 3**, tandis que les conditions de PCR sont décrites dans le **tableau 4**. Suite à la PCR, la présence d'un amplicon formé entre les couples d'amorces correspondant aux extrémités 5' ou 3' indique la présence du gène recombiné à la position initiale du gène *pppg2*, confirmant le succès de la recombinaison.

De la même manière, le génotypage des clones #2 et #3, obtenus après recombinaison homologue de *pppg3*, s'est fait par PCR avec les amorces adéquates #704 et PcmV-R pour l'extrémité 5', puis et #705 et CMVPA-F2 pour l'extrémité 3'. Enfin, le génotypage du clone #4, double mutant *pppg2/pppg3*, obtenu après recombinaison homologue de *PpPG3*, dans un mutant confirmé *pppg2*, est effectué de la même manière, par PCR avec les amorces adéquats 'PG3 KO F' et PcmV-R pour l'extrémité 5' et 'PG3KO R' et nptII-F1 pour l'extrémité 3'.

III.4.4. Génotypage des mutants CRISPR

Les mutants de *Physcomitrium patens* obtenus par transformation par la méthode CRISPR-Cas9, notamment le clone #138, présentant un phénotype particulier lors de sa croissance, a été génotypé. Pour cela, son ADN génomique a d'abord été extrait par la même méthode que présentée précédemment. Puis les gènes des 4 PGs ciblées (correspondant au ARN guide utilisés) ont été séquencés par la méthode Sanger (Dehairs et al., 2016). Des amorces pour les extrémités 5' et 3' de chacun des gènes *PPPG1*, *PPPG2*, *PPPG3* et *PPPG6* ont donc été dessinées. Les chromatogrammes obtenus ont été alignés aux séquences des gènes de référence pour établir les cartes de mutations ou délétions. Les séquences d'amino-acides résultantes ont été utilisées pour simuler les structures tridimensionnelles à l'aide d'Alphafold pour comparer les structures des protéines mutantes avec celles des protéines natives.

III.4.5. Composition en sucres neutres et acides de la paroi

Les monosaccharides pariétaux des mutants de *Physcomitrium patens* ont été obtenus à partir de 100 mg de tissus frais de sauvage, et des mutants *pppg2*, *pppg3* et *pppg2/pppg3*, âgés de 7 jours, 14 jours, 21 jours ou 28 jours. Pour chaque génotype et chaque temps de croissance, quatre réplicats sont faits. Les tissus récoltés sont d'abord lavés deux fois à l'éthanol absolu pendant 15 minutes à 70°C pour retirer les pigments et sucres solubles. Après centrifugation, les culots sont repris dans du tampon tris-HCl 50mM à pH7,2 SDS 1% pendant 30 minutes à 70°C. Puis les parois sont culotés par centrifugation à 7500 rpm et lavés à l'eau, à l'éthanol, puis une seconde fois à l'eau avant d'être congelés à -80°C puis lyophilisés. Les parois extraites et lyophilisées sont resuspendues dans 1 mL de phosphate de potassium monobasique KH_2PO_4 100mM pH6,8 avant de subir un digestion par l'α-amylase à 0,51 U/µL pendant une journée à température ambiante sous agitation. Une addition supplémentaire d'α-amylase est effectuée en fin de journée pour agir durant la nuit. L'α-amylase a pour rôle d'hydrolyser l'amidon qui pourrait biaiser les résultats de l'analyse des monosaccharides de la paroi. Après les digestions, l'α-amylase est retirée par centrifugation à 7500 rpm et le culot est lavé à l'eau, à l'éthanol, puis de nouveau à l'eau avant congelation et lyophilisation. Le lyophilisat obtenu sera pesé pour obtenir 1 mg qui subira une hydrolyse acide avec, dans un tube en verre, 1 mL d'acide trifluoroacétique 4N (ATFA 4N) pendant 4 heures à 100°C dans un bain sec sous sorbonne. Cette étape est nécessaire au clivage de toutes les liaisons osidiques afin d'obtenir les monosaccharides constitutifs de la paroi cellulaire.

Après hydrolyse, l'acide est évaporé sous sorbonne, puis les monosaccharides de la paroi seront resuspendus dans 1 mL d'eau mQ à une concentration de 1 mg/mL, puis filtré à 0,22µm dans des vials pour l'analyse en HPAEC (High Performance Anion Exchange Chromatography).

L'analyse des sucres est effectuée sur un systême ICS3000 avec ampérométrie pulsée (HPAEC-PAD) (Dionex, Thermo scientific, France), équipée avec une colonne CarboPac PA-1 (ID 4 mm x 250 mm) et une colonne de garde CarboPac PA1 (ID 4 mm x 50 mm). Le flux de passage dans les colonne est maintenu à 1 mL par minute, et la colonne est maintenue à 30°C. Pour la quantification des oses neutres, les phases mobiles sont : (A) H_2O, (B) NaOH 160 mM et (C) NaOH 200 mM. Les profils d'élutions sont comme suit : Entre 0 et 25 minutes, 90% de A et 10% de B. Entre 25 et 26 minutes, augmentation progressive de 0% à 100% de C. Entre 26 et 35 minutes, 100% C. Entre 35 et 36 minutes, diminution de 100% à 0% de C. Puis de 36 à 50 minutes, 90% A et 10% B. Tandis que pour la quantification des acides uroniques, tels que les acides D-galacturoniques et les acides glucuroniques, les phases mobiles sont : (A) NaOH 160mM et (B) NaOH 160 mM + NaOAc 600 mM. Les profiles d'élutions sont comme suit : Entre 0 et 5 minutes, 100% A. Entre 5 et 35 minutes, augmentation progressive de 0 à 100% B. De 35 à 40 minutes, 100% B. De 40 à 42 minutes, diminution de 100% à 0% de B et remplacement jusqu'à équilibration par 100% de A de 42 à 50 minutes. Pour tous les monosaccharides identifiés, des standards commerciaux d'Arabinose, de Fucose, de Galactose, de Glucose, de Mannose, de Rhmanose, de Xylose, d'acide galacturonique et d'acide glucuronique (Sigma-Aldrich, France) sont utilisés. Les résultats sont présentés en concentrations massiques, donc en gramme de sucre correspondant pour 100 grammes de paroi cellulaire sèche.

Tableau 6 : Méthode utilisée pour l'acquisition des spectres avec le logiciel LabSolutions IR.

Résolution	4
Unité de mesure	%T (Transmittance)
Apodisation	Triangle carré
Nombre de scans par mesure	80
Etendues des longueurs d'ondes émises	De 700 à 4000 cm^{-1}

III.4.6. Analyses de la paroi des mutants par FTIR

Les données de spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) ont été obtenues pour des échantillons de tissus de *Physcomitrium patens* sauvage, et des mutants *pppg2*, *pppg3* et *pppg2/pppg3*, âgés de 7 jours, 14 jours, 21 jours ou 28 jours, tous réalisés en quatre réplicats. Pour chacun, les parois ont été extraites à partir de 100 mg de matière fraiche, lavée deux fois dans de l'éthanol absolu 15 minutes à 70°C pour retirer les pigments et sucres solubles. Elles sont ensuite centrifugées et leurs culots sont repris dans du tampon tris-HCl 50mM à pH7,2 SDS 1% pendant 30 minutes à 70°C avant d'être de nouveau centrifugés pour être culotés, et lavés à l'eau et l'éthanol deux fois avant d'être congelés à -80°C et lyophilisés. La matière sèche ainsi obtenue est analysée en spectrophotométrie FTIR.

Les spectres ont été mesurés avec le spectrophotomètre IR IRAffinity-1S, équipé d'un prisme en germanium Miracle 10 Ge. La méthode utilisée pour l'acquisition des spectres est définie dans le **tableau 5**. Les spectres obtenus sont ensuite traités sur le logiciel R (version 4.2.1) et R studio. La conversion des spectres en absorbance a été faite selon la formule suivante :

$$A = 2 - \log(T)$$

Où A est la valeur en Absorbance et T la valeur en Transmittance. Pour chaque spectre, la ligne de base est tracée puis soustraite entre deux minima du spectre. Le premier minima est compris entre 875 cm^{-1} et 960 cm^{-1}, puis le second entre 1740 cm^{-1} et 1850 cm^{-1}. Enfin, chaque spectre est normalisé par son aire sous la courbe. Les spectres ont ensuite été tracés avec les packages colorspace, grDevices, et graphics sur R. Enfin, pour chaque lignée (sauvage WT, mutants *pppg2*, *pppg3* et *pppg2/pppg3*) et chaque jour de développement (7j, 14j, 21j et 28jours), les spectres ont été centrés et réduits et l'intensité moyenne de chaque échantillon pour toutes les fréquences a été calculée. La heatmap, quant à elle a été obtenue en représentant, pour chaque échantillon, l'intensité en fonction de la fréquence sous forme de matrice colorée à l'aide de ggplot2 sur R. Pour finir, les degrés de méthylation des pectines, ont été calculés à partir des absorbances aux fréquences 1740 cm^{-1} et 1630 cm^{-1} selon la formule suivante :

$$DM = \frac{A1740}{(A1740 + A1630)} \times 100$$

Où A1740 correspond à l'absorbance mesurée à la longueur d'onde 1740 cm^{-1}, correspondant aux vibrations des liaisons C=O des groupes carboxyl méthylestérifiés. Tandis que A1630 correspond à l'absorbance mesurée à la longueur d'onde 1630 cm^{-1} qui correspond aux vibrations des liaisons O=C-O des groupes dé-estérifiées. Cette formule permet donc de calculer le pourcentage des résidus méthylés par rapport au total (Manrique & Lajolo, 2002).

III.4.7. Activité polygalacturonase des mutants

Dans le but de mesurer les niveaux d'activité polygalacturonase dans les différentes conditions testées (génotypes et points de cinétique de développement), des extraits enrichis en protéines pariétales ont été utilisés. Pour ce faire, 50 mg de matériel végétal frais sont broyés et mélangés dans 200 µL de tampon d'extraction Acétate pH5 + LiCl (Acétate de sodium $C_2H_3NaO_2$ 50 mM pH5 + Chlorure de lithium LiCl 1M) puis mis sous agitation à 4°C et 200 rpm pendant une heure. Les extraits sont ensuite centrifugés à 4°C et 14000 rpm pendant 30 minutes, puis filtrés dans des colonnes de filtration Amicon Ultra 0,5 3 kDa (UFC5003, Millipore – Sigma Aldrich), équilibrées avec du tampon acétate de sodium $C_2H_3NaO_2$ 50 mM pH5, pour éliminer le chlorure de lithium. Enfin, ils sont conservés à 4°C en attendant le dosage de l'activité polygalacturonase.

L'activité polygalacturonase a été mesurée par la méthode Nelson, faisant intervenir le cuivre, qui est réduit par les acides galacturoniques (Cu^{2+} → Cu^{+}), qui réduira ensuite le molybdate du tampon d'activité utilisé, ce qui lui donnera une coloration bleue, mesurable par spectrométrie à 620 nm. Pour les mesures d'activités, ont été déposés, en triplicats dans des plaques 96 puits, 6µg d'extrait protéique dans 25 µL de tampon NaOAc 50 mM pH5, puis 25 µL de PGA 1%. Le substrat est digéré ainsi toute une nuit à 37°C. Puis 75 µL de réactif cuivrique, préparé à partir de 25 mL de réactif A (Pour 1 litre, 25g de sodium carbonate Na_2CO_3, 25g de potassium sodium tartrate $KNaC_4H_4O_6$, 20g de bicarbonate de sodium $NaHCO_3$ et 200 g de sulfate de sodium Na_2SO_4) et 1 mL de réactif B (Pour 100 mL, 15g de sulfate de cuivre pentahydrate $CuSO_4.5H_2O$ et une goutte d'acide sulfurique H_2SO_4). La réaction est ensuite incubée durant 30 minutes à 80°C, permettant la réduction des ions cuivrique Cu^{2+} par les sucres réducteurs. La réaction est laissée à refroidir avant l'ajout de 75 µL d'arsenomolybdate (Pour 250 mL de solution, 12,5g d'ammonium molybdate $(NH4)_2MoO_4$, 10 mL d'acide sulfurique H_2SO_4, 1,5 g de sodium arsenate dibasique heptahydrate $Na_2HASO_4.7H_2O$, puis stockée à 37°C La gamme d'acide galacturonique utilisée est comprise entre 0 et 100 µg/mL.

sous film opaque plusieurs heures avant la réaction), où le molybdate sera réduit par le cuivre Cu^{+}, provoquant une coloration du milieu, mesurable par spectrométrie à 620 nm. L'activité totale des PGs de chaque puits est alors quantifiée par comparaison avec le taux de sucres réducteurs mesurés par une gamme d'acide galacturonique de concentrations croissantes. Les résultats de l'activité des polygalacturonases sont exprimés en picomoles de GalA.μg^{-1} de protéine.

REFERENCES

Abbott, D. W., & Boraston, A. B. (2007). A family 2 pectate lyase displays a rare fold and transition metal-assisted β-elimination. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(48), 35328–35336. https://doi.org/10.1074/jbc.M705511200

Abdel-Massih, R. M., Baydoun, E. A. H., & Brett, C. T. (2003). In vitro biosynthesis of 1,4-β-galactan attached to a pectin-xyloglucan complex in pea. *Planta*, *216*(3), 502–511. https://doi.org/10.1007/s00425-002-0861-y

Alba, K., Bingham, R. J., & Kontogiorgos, V. (2017). Mesoscopic structure of pectin in solution. *Biopolymers*, *107*(6). https://doi.org/10.1002/bip.23016

Al-Qsous, S., Carpentier, E., Klein-Eude, D., Burel, C., Mareck, A., Dauchel, H., Gomord, V., & Balangé, A. P. (2004). Identification and isolation of a pectin methylesterase isoform that could be involved in flax cell wall stiffening. *Planta*, *219*(2), 369–378. https://doi.org/10.1007/s00425-004-1246-1

Altaner, C. M., & Jarvis, M. C. (2008). Modelling polymer interactions of the "molecular Velcro" type in wood under mechanical stress. *Journal of Theoretical Biology*, *253*(3), 434–445. https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2008.03.010

Amos, R. A., Atmodjo, M. A., Huang, C., Gao, Z., Venkat, A., Taujale, R., Kannan, N., Moremen, K. W., & Mohnen, D. (2022). Polymerization of the backbone of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan I. *Nature Plants*, *8*(11), 1289–1303. https://doi.org/10.1038/s41477-022-01270-3

Anderson, C. T., Carroll, A., Akhmetova, L., & Somerville, C. (2010). Real-time imaging of cellulose reorientation during cell wall expansion in Arabidopsis roots. *Plant Physiology*, *152*(2), 787–796. https://doi.org/10.1104/pp.109.150128

Anderson, C. T., & Kieber, J. J. (2020). *Dynamic Construction, Perception, and Remodeling of Plant Cell Walls*. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-081519

Anderson, C. T., & Pelloux, J. (2025). *The Dynamics, Degradation, and Afterlives of Pectins: Influences on Cell Wall Assembly and Structure, Plant Development and Physiology, Agronomy, and Biotechnology Pectin: an acidic polysaccharide present in plant cell walls*. *52*, 36. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-083023

André-Leroux, G., Tessier, D., & Bonnin, E. (2005). Action pattern of Fusarium moniliforme endopolygalacturonase towards pectin fragments: Comprehension and prediction. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, *1749*(1), 53–64. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.02.008

A. Nebenführ, & L. Andrew Staehelin. (2001). Mobile factories : Golgi dynamics in plant cells. *TRENDS in Plant Science*, *6*(4), 160–167.

Atta, M. B., & Ruiz-Larrea, F. (2022). *Fungal Pectinases in Food Technology*. www.intechopen.com

Balkova, D., Mala, K., Hejatko, J., Panzarova, K., Abdelhakim, L., Pleskacova, B., & Samalova, M. (2025). Differential expression and localization of expansins in Arabidopsis shoots: implications for cell wall dynamics and drought tolerance. *Frontiers in Plant Science*, *16*. https://doi.org/10.3389/fpls.2025.1546819

Barnes, W. J., Koj, S., Black, I. M., Archer-Hartmann, S. A., Azadi, P., Urbanowicz, B. R., Peña, M. J., & O'Neill, M. A. (2021). Protocols for isolating and characterizing polysaccharides from plant cell walls: a case study using rhamnogalacturonan-II. *Biotechnology for Biofuels*, *14*(1). https://doi.org/10.1186/s13068-021-01992-0

Barnett, J. R., & Bonham, V. A. (2004). Cellulose microfibril angle in the cell wall of wood fibres. In *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* (Vol. 79, Number 2, pp. 461–472). https://doi.org/10.1017/S1464793103006377

Beauzamy, L., Derr, J., & Boudaoud, A. (2015). Quantifying hydrostatic pressure in plant cells by using indentation with an atomic force microscope. *Biophysical Journal*, *108*(10), 2448–2456. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.03.035

Beike, A. K., Von Stackelberg, M., Schallenberg-Rüdinger, M., Hanke, S. T., Follo, M., Quandt, D., McDaniel, S. F., Reski, R., Tan, B. C., & Rensing, S. A. (2014). Molecular evidence for convergent evolution and allopolyploid speciation within the Physcomitrium-Physcomitrella species complex. *BMC Evolutionary Biology*, *14*(1). https://doi.org/10.1186/1471-2148-14-158

Beldman, G., Vincken, J. P., Schols, H. A., Meeuwsen, P. J. A., Herweijer, M., & Voragen, A. G. J. (2003). Degradation of differently substituted xylogalacturonans by endoxylogalacturonan hydrolase and endopolygalacturonases. *Biocatalysis and Biotransformation*, *21*(4–5), 189–198. https://doi.org/10.1080/10242420310001618546

Bergonci, T., Silva-Filho, M. C., & Moura, D. S. (2014). Antagonistic relationship between AtRALF1 and brassinosteroid regulates cell expansion-related genes. *Plant Signaling and Behavior*, *9*(10). https://doi.org/10.4161/15592324.2014.976146

Berry, E. A., Tran, M. L., Dimos, C. S., Budziszek, M. J., Scavuzzo-Duggan, T. R., & Roberts, A. W. (2016). Immuno and affinity cytochemical analysis of cell wall composition in the moss Physcomitrella patens. *Frontiers in Plant Science*, *7*(MAR2016). https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00248

Biswal, A. K., Tan, L., Atmodjo, M. A., Demartini, J., Gelineo-Albersheim, I., Hunt, K., Black, I. M., Mohanty, S. S., Ryno, D., Wyman, C. E., & Mohnen, D. (2017). Comparison of four glycosyl residue composition methods for effectiveness in detecting sugars from cell walls of dicot and grass tissues. *Biotechnology for Biofuels*, *10*(1). https://doi.org/10.1186/s13068-017-0866-1

Bonavita, A., Carratore, V., Ciardiello, M. A., Giovane, A., Servillo, L., & D'Avino, R. (2016). Influence of pH on the Structure and Function of Kiwi Pectin Methylesterase Inhibitor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *64*(29), 5866–5876. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b01718

Bonnin, E., Clavurier, K., Daniel, S., Kauppinen, S., Mikkelsen, J. D. M., & Thibault, J. F. (2008). Pectin acetylesterases from Aspergillus are able to deacetylate homogalacturonan as well as rhamnogalacturonan. *Carbohydrate Polymers*, *74*(3), 411–418. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.03.014

Bonnin, E., Garnier, C., & Ralet, M. C. (2014). Pectin-modifying enzymes and pectin-derived materials: Applications and impacts. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 98, Number 2, pp. 519–532). https://doi.org/10.1007/s00253-013-5388-6

Bosch, M., Cheung, A. Y., & Hepler, P. K. (2005). Pectin methylesterase, a regulator of pollen tube growth. *Plant Physiology*, *138*(3), 1334–1346. https://doi.org/10.1104/pp.105.059865

Bouvier, F., Linka, N., Isner, J. C., Mutterer, J., Weber, A. P. M., & Camara, B. (2006). Arabidopsis SAMT1 defines a plastid transporter regulating plastid biogenesis and plant development. *Plant Cell*, *18*(11), 3088–3105. https://doi.org/10.1105/tpc.105.040741

Broxterman, S. E., & Schols, H. A. (2018). Interactions between pectin and cellulose in primary plant cell walls. *Carbohydrate Polymers*, *192*, 263–272. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.03.070

Burton, R. A., Gidley, M. J., & Fincher, G. B. (2010). Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls. In *Nature Chemical Biology* (Vol. 6, Number 10, pp. 724–732). Nature Publishing Group. https://doi.org/10.1038/nchembio.439

Caffall, K. H., & Mohnen, D. (2009). The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research*, *344*(14), 1879–1900. https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.05.021

Camardella, L., Carratore, V., Ciardiello, M. A., Servillo, L., Balestrieri, C., & Giovane, A. (2000). Kiwi protein inhibitor of pectin methylesterase: Amino-acid sequence and structural importance of two disulfide bridges. *European Journal of Biochemistry*, *267*(14), 4561–4565. https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01510.x

Carafa, A., Duckett, J. G., Knox, J. P., & Ligrone, R. (2005). Distribution of cell-wall xylans in bryophytes and tracheophytes: New insights into basal interrelationships of land plants. *New Phytologist*, *168*(1), 231–240. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01483.x

Carton, C., Šafran, J., Mohanaraj, S., Roulard, R., Domon, J.-M., Bassard, S., Facon, N., Tisserant, B., Mongelard, G., Gutierrez, L., Randoux, B., Magnin-Robert, M., Pelloux, J., Pau-Roblot, C., & Sahraoui, A. L.-H. (2024). *Oligogalacturonides, produced by enzymatic degradation of sugar beet by-products, confer partial protection against wheat powdery mildew*. https://doi.org/10.1101/2024.11.15.623731

Carton, C., Šafran, J., Mohanaraj, S., Roulard, R., Domon, J.-M., Bassard, S., Facon, N., Tisserant, B., Mongelard, G., Gutierrez, L., Randoux, B., Magnin-Robert, M., Pelloux, J., Pau-Roblot, C., & Sahraoui, A. L.-H. (2025). Valorization of Sugar Beet Byproducts into Oligogalacturonides with Protective Activity against Wheat Powdery Mildew. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2025** 73 (38), 24237-24250. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5c05099

Castilleux, R., Plancot, B., Vicré, M., Nguema-Ona, E., & Driouich, A. (2021). Extensin, an underestimated key component of cell wall defence? In *Annals of Botany* (Vol. 127, Number 6, pp. 709–713). Oxford University Press. https://doi.org/10.1093/aob/mcab001

Cavalier, D. M., & Keegstra, K. (2006). Two xyloglucan xylosyltransferases catalyze the addition of multiple xylosyl residues to cellohexaose. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(45), 34197–34207. https://doi.org/10.1074/jbc.M606379200

Chebli, Y., & Geitmann, A. (2024). Pectate lyase-like lubricates the male gametophyte's path toward its mating partner. *Plant Physiology*, *194*(1), 124–136. https://doi.org/10.1093/plphys/kiad481

Cheng, X., Mwaura, B. W., Chang Stauffer, S. R., & Bezanilla, M. (2020). A fully functional ROP fluorescent fusion protein reveals roles for this GTPase in subcellular and tissue-level patterning. *Plant Cell*, *32*(11), 3436–3451. https://doi.org/10.1105/TPC.20.00440

Chen, X. Y., & Kim, J. Y. (2009). Callose synthesis in higher plants. In *Plant Signaling and Behavior* (Vol. 4, Number 6, pp. 489–492). https://doi.org/10.4161/psb.4.6.8359

Cho, Y., Jang, M., Srivastava, A., Jang, J. H., Soung, N. K., Ko, S. K., Kang, D. O., Ahn, J. S., & Kim, B. Y. (2015). A pectate lyase-coding gene abundantly expressed during early stages of infection is required for full virulence in Alternaria brassicicola. *PLoS ONE*, *10*(5). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127140

Christensen, N. M., Faulkner, C., & Oparka, K. (2009). Evidence for unidirectional flow through plasmodesmata. *Plant Physiology*, *150*(1), 96–104. https://doi.org/10.1104/pp.109.137083

Cosgrove, D. J. (2014). Re-constructing our models of cellulose and primary cell wall assembly. In *Current Opinion in Plant Biology* (Vol. 22, pp. 122–131). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.11.001

Cosgrove, D. J. (2015). Plant expansins: Diversity and interactions with plant cell walls. In *Current Opinion in Plant Biology* (Vol. 25, pp. 162–172). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.05.014

Cosgrove, D. J. (2016). Plant cell wall extensibility: Connecting plant cell growth with cell wall structure, mechanics, and the action of wall-modifying enzymes. In *Journal of Experimental Botany* (Vol. 67, Number 2, pp. 463–476). Oxford University Press. https://doi.org/10.1093/jxb/erv511

Cosgrove, D. J., & Jarvis, M. C. (2012). Comparative structure and biomechanics of plant primary and secondary cell walls. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 3, Number AUG). Frontiers Research Foundation. https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00204

Coudert, Y., Bell, N. E., Edelin, C., & Harrison, C. J. (2017). Multiple innovations underpinned branching form diversification in mosses. *New Phytologist*, *215*(2), 840–850. https://doi.org/10.1111/nph.14553

Cove, D. (2005). The moss Physcomitrella patens. In *Annual Review of Genetics* (Vol. 39, pp. 339–358). https://doi.org/10.1146/annurev.genet.39.073003.110214

Cumming, C. M., Rizkallah, H. D., McKendrick, K. A., Abdel-Massih, R. M., Baydoun, E. A. H., & Brett, C. T. (2005). Biosynthesis and cell-wall deposition of a pectin-xyloglucan complex in pea. *Planta*, *222*(3), 546–555. https://doi.org/10.1007/s00425-005-1560-2

Daku, R. M., Rabbi, F., Buttigieg, J., Coulson, I. M., Horne, D., Martens, G., Ashton, N. W., & Suh, D. Y. (2016). PpASCL, the Physcomitrella patens anther-specific chalcone synthase-like enzyme implicated in sporopollenin biosynthesis, is needed for integrity of the moss spore wall and spore viability. *PLoS ONE*, *11*(1). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146817

Dauphin, B. G., Ropartz, D., Ranocha, P., Rouffle, M., Carton, C., Le Ru, A., Martinez, Y., Fourquaux, I., Ollivier, S., Mac-Bear, J., Trezel, P., Geairon, A., Jamet, E., Dunand, C., Pelloux, J., Ralet, M. C., & Burlat, V. (2024). TBL38 atypical homogalacturonan-acetylesterase activity and cell wall microdomain localization in Arabidopsis seed mucilage secretory cells. *IScience*, *27*(5). https://doi.org/10.1016/j.isci.2024.109666

Davidsson, P., Broberg, M., Kariola, T., Sipari, N., Pirhonen, M., & Palva, E. T. (2017). Short oligogalacturonides induce pathogen resistance-associated gene expression in Arabidopsis Physco. *BMC Plant Biology*, *17*(1). https://doi.org/10.1186/s12870-016-0959-1

Decker, D., & Kleczkowski, L. A. (2019). UDP-sugar producing pyrophosphorylases: Distinct and essential enzymes with overlapping substrate specificities, providing de novo precursors for glycosylation reactions. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 9). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01822

de Keijzer, J., Rios, A. F., & Willemsen, V. (2021). Physcomitrium patens: A single model to study oriented cell divisions in 1d to 3d patterning. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Number 5, pp. 1–16). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/ijms22052626

Delmer, D., Dixon, R. A., Keegstra, K., & Mohnen, D. (2024). The plant cell wall—dynamic, strong, and adaptable—is a natural shapeshifter. In *Plant Cell* (Vol. 36, Number 5, pp. 1257–1311). American Society of Plant Biologists. https://doi.org/10.1093/plcell/koad325

Derbyshire, P., McCann, M. C., & Roberts, K. (2007). Restricted cell elongation in Arabidopsis hypocotyls is associated with a reduced average pectin esterification level. *BMC Plant Biology*, *7*. https://doi.org/10.1186/1471-2229-7-31

Deshpande, A. B., Anamika, K., Jha, V., Chidley, H. G., Oak, P. S., Kadoo, N. Y., Pujari, K. H., Giri, A. P., & Gupta, V. S. (2017). Transcriptional transitions in Alphonso mango (Mangifera indica L.) during fruit development and ripening explain its distinct aroma and shelf life characteristics. *Scientific Reports*, *7*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-017-08499-5

Dhanoa, P. K., Sinclair, A. M., Mullen, R. T., & Mathur, J. (2006). Illuminating subcellular structures and dynamics in plants: A fluorescent protein toolbox. In *Canadian Journal of Botany* (Vol. 84, Number 4, pp. 515–522). https://doi.org/10.1139/B06-060

Dick-Pérez, M., Zhang, Y., Hayes, J., Salazar, A., Zabotina, O. A., & Hong, M. (2011). Structure and interactions of plant cell-wall polysaccharides by two- and three-dimensional magic-angle-spinning solid-state NMR. *Biochemistry*, *50*(6), 989–1000. https://doi.org/10.1021/bi101795q

Di Matteo, A., Giovane, A., Raiola, A., Camardella, L., Bonivento, D., De Lorenzo, G., Cervone, F., Bellincampi, D., & Tsemoglou, D. (2005). Structural basis for the interaction between pectin methylesterase and a specific inhibitor protein. *Plant Cell*, *17*(3), 849–858. https://doi.org/10.1105/tpc.104.028886

Draeger, C., Ndinyanka Fabrice, T., Gineau, E., Mouille, G., Kuhn, B. M., Moller, I., Abdou, M. T., Frey, B., Pauly, M., Bacic, A., & Ringli, C. (2015). Arabidopsis leucine-rich repeat extensin (LRX) proteins modify cell wall composition and influence plant growth. *BMC Plant Biology*, *15*(1). https://doi.org/10.1186/s12870-015-0548-8

Dünser, K., Gupta, S., Herger, A., Feraru, M. I., Ringli, C., & Kleine-Vehn, J. (2019). Extracellular matrix sensing by FERONIA and Leucine-Rich Repeat Extensins controls vacuolar expansion during cellular elongation in Arabidopsis thaliana . *The EMBO Journal*, *38*(7). https://doi.org/10.15252/embj.2018100353

Egelund, J., Damager, I., Faber, K., Olsen, C. E., Ulvskov, P., & Petersen, B. L. (2008). Functional characterisation of a putative rhamnogalacturonan II specific xylosyltransferase. *FEBS Letters*, *582*(21–22), 3217–3222. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.08.015

Egelund, J., Petersen, B. L., Motawia, M. S., Damager, I., Faik, A., Olsen, C. E., Ishii, T., Clausen, H., Ulvskov, P., & Geshi, N. (2006). Arabidopsis thaliana RGXT1 and RGXT2 encode golgi-localized (1,3)-α-D-xylosyltransferases involved in the synthesis of pectic rhamnogalacturonan-II. *Plant Cell*, *18*(10), 2593–2607. https://doi.org/10.1105/tpc.105.036566

Eklund, D. M., Svensson, E. M., & Kost, B. (2010). Physcomitrella patens: A model to investigate the role of RAC/ROP GTPase signalling in tip growth. In *Journal of Experimental Botany* (Vol. 61, Number 7, pp. 1917–1937). https://doi.org/10.1093/jxb/erq080

Ferrari, S., Savatin, D. V., Sicilia, F., Gramegna, G., Cervone, F., & De Lorenzo, G. (2013). Oligogalacturonides: Plant damage-associated molecular patterns and regulators of growth and development. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 4, Number MAR). Frontiers Research Foundation. https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00049

Ferrari, S., Vairo, D., Ausubel, F. M., Cervone, F., & De Lorenzo, G. (2003). Tandemly duplicated Arabidopsis genes that encode polygalacturonase-inhibiting proteins are regulated coordinately by different signal transduction pathways in response to fungal infection. *Plant Cell*, *15*(1), 93–106. https://doi.org/10.1105/tpc.005165

Frank, W., Decker, E. L., & Reski, R. (2005). Molecular tools to study Physcomitrella patens. In *Plant Biology* (Vol. 7, Number 3, pp. 220–227). https://doi.org/10.1055/s-2005-865645

Fries, M., Ihrig, J., Brocklehurst, K., Shevchik, V. E., & Pickersgill, R. W. (2007). Molecular basis of the activity of the phytopathogen pectin methylesterase. *EMBO Journal*, *26*(17), 3879–3887. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601816

Fuertes-Rabanal, M., Rebaque, D., Largo-Gosens, A., Encina, A., & Mélida, H. (2025). Cell walls: a comparative view of the composition of cell surfaces of plants, algae, and microorganisms. In *Journal of Experimental Botany* (Vol. 76, Number 10, pp. 2614–2645). Oxford University Press. https://doi.org/10.1093/jxb/erae512

Funakawa, H., & Miwa, K. (2015). Synthesis of borate cross-linked rhamnogalacturonan II. *Frontiers in Plant Science*, *6*(APR). https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00223

Geitmann, A. (2010). Mechanical modeling and structural analysis of the primary plant cell wall. In *Current Opinion in Plant Biology* (Vol. 13, Number 6, pp. 693–699). https://doi.org/10.1016/j.pbi.2010.09.017

Gigli-Bisceglia, N., van Zelm, E., Huo, W., Lamers, J., & Testerink, C. (2022). Arabidopsis root responses to salinity depend on pectin modification and cell wall sensing. *Development (Cambridge)*, *149*(12). https://doi.org/10.1242/dev.200363

González-Carranza, Z. H., Elliott, K. A., & Roberts, J. A. (2007). Expression of polygalacturonases and evidence to support their role during cell separation processes in Arabidopsis thaliana. *Journal of Experimental Botany*, *58*(13), 3719–3730. https://doi.org/10.1093/jxb/erm222

Gorelova, V. (2023). In muro matters: Structural differences of polygalacturonases define their specific roles in plant development. *Plant Cell*, *35*(8), 2718–2719. https://doi.org/10.1093/plcell/koad147

Gou, J. Y., Miller, L. M., Hou, G., Yu, X. H., Chen, X. Y., & Liu, C. J. (2012). Acetylesterase-mediated deacetylation of pectin impairs cell elongation, pollen germination, and plant reproduction. *Plant Cell*, *24*(1), 50–65. https://doi.org/10.1105/tpc.111.092411

Griffiths, J. S., & North, H. M. (2017). Sticking to cellulose: exploiting Arabidopsis seed coat mucilage to understand cellulose biosynthesis and cell wall polysaccharide interactions. In *New Phytologist* (Vol. 214, Number 3, pp. 959–966). Blackwell Publishing Ltd. https://doi.org/10.1111/nph.14468

Gu, F., & Nielsen, E. (2013). Targeting and regulation of cell wall synthesis during tip growth in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, *55*(9), 835–846. https://doi.org/10.1111/jipb.12077

Guillory, A., Lopez-Obando, M., Bouchenine, K., Le Bris, P., Lecureuil, A., Pillot, J. P., Steinmetz, V., Boyer, F. D., Rameau, C., De Saint Germain, A., & Bonhomme, S. (2024). SUPPRESSOR OF MAX2 1-LIKE (SMXL) homologs are MAX2-dependent repressors of Physcomitrium patens growth. *Plant Cell*, *36*(5), 1655–1672. https://doi.org/10.1093/plcell/koae009

Gummadi, S. N., & Kumar, D. S. (2005). Microbial pectic transeliminases. In *Biotechnology Letters* (Vol. 27, Number 7, pp. 451–458). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/s10529-005-2197-8

Haas, K. T., Wightman, R., Meyerowitz, E. M., & Peaucelle, A. (2020). Pectin homogalacturonan nanofilament expansion drives morphogenesis in plant epidermal cells. *Science*. https://doi.org/10.17632/xb3f5jrbwv.1

Haghighat, M., Teng, Q., Zhong, R., & Ye, Z. H. (2016). Evolutionary conservation of xylan biosynthetic genes in selaginella moellendorffii and physcomitrella patens. *Plant and Cell Physiology*, *57*(8), 1707–1719. https://doi.org/10.1093/pcp/pcw096

Hamann, T. (2015). The plant cell wall integrity maintenance mechanism - Concepts for organization and mode of action. In *Plant and Cell Physiology* (Vol. 56, Number 2, pp. 215–223). Oxford University Press. https://doi.org/10.1093/pcp/pcu164

Hamant, O., & Traas, J. (2010). The mechanics behind plant development. In *New Phytologist* (Vol. 185, Number 2, pp. 369–385). https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03100.x

Harholt, J., Sørensen, I., Fangel, J., Roberts, A., Willats, W. G. T., Scheller, H. V., Petersen, B. L., Banks, J. A., & Ulvskov, P. (2012). The glycosyltransferase repertoire of the spikemoss selaginella moellendorffii and a comparative study of its cell wall. *PLoS ONE*, *7*(5). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035846

Harper, A. D., & Bar-Peled, M. (2002). Biosynthesis of UDP-xylose. Cloning and characterization of a novel arabidopsis gene family, UXS, encoding soluble and putative membrane-bound UDP-glucuronic acid decarboxylase isoforms. *Plant Physiology*, *130*(4), 2188–2198. https://doi.org/10.1104/pp.009654

Harrison, C. J., Roeder, A. H. K., Meyerowitz, E. M., & Langdale, J. A. (2009). Local Cues and Asymmetric Cell Divisions Underpin Body Plan Transitions in the Moss Physcomitrella patens. *Current Biology*, *19*(6), 461–471. https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.02.050

Hays, Q., Lerouge, P., Ropitaux, M., Anderson, C. T., & Lehner, A. (2025). Storming the barricades of rhamnogalacturonan-II synthesis and function. In *Plant Cell* (Vol. 37, Number 6). American Society of Plant Biologists. https://doi.org/10.1093/plcell/koaf088

Hirakawa, Y., Uchida, N., Yamaguchi, Y. L., Tabata, R., Ishida, S., Ishizaki, K., Nishihama, R., Kohchi, T., Sawa, S., & Bowman, J. L. (2019). Control of proliferation in the haploid meristem by CLE peptide signaling in marchantia polymorpha. *PLoS Genetics*, *15*(3). https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007997

Hiss, M., Laule, O., Meskauskiene, R. M., Arif, M. A., Decker, E. L., Erxleben, A., Frank, W., Hanke, S. T., Lang, D., Martin, A., Neu, C., Reski, R., Richardt, S., Schallenberg-Rüdinger, M., Szövényi, P., Tiko, T., Wiedemann, G., Wolf, L., Zimmermann, P., & Rensing, S. A. (2014). Large-scale gene expression profiling data for the model moss Physcomitrella patens aid understanding of developmental progression, culture and stress conditions. *Plant Journal*, *79*(3), 530–539. https://doi.org/10.1111/tpj.12572

Hiss, M., Meyberg, R., Westermann, J., Haas, F. B., Schneider, L., Schallenberg-Rüdinger, M., Ullrich, K. K., & Rensing, S. A. (2017). Sexual reproduction, sporophyte development and molecular variation in the model moss Physcomitrella patens: introducing the ecotype Reute. *Plant Journal*, *90*(3), 606–620. https://doi.org/10.1111/tpj.13501

Hocq, L., Guinand, S., Habrylo, O., Voxeur, A., Tabi, W., Safran, J., Fournet, F., Domon, J. M., Mollet, J. C., Pilard, S., Pau-Roblot, C., Lehner, A., Pelloux, J., & Lefebvre, V. (2020). The exogenous application of AtPGLR, an endo-polygalacturonase, triggers pollen tube burst and repair. *Plant Journal*, *103*(2), 617–633. https://doi.org/10.1111/tpj.14753

Hocq, L., Habrylo, O., Sénéchal, F., Voxeur, A., Pau-Roblot, C., Safran, J., Fournet, F., Bassard, S., Battu, V., Demailly, H., Tovar, J. C., Pilard, S., Marcelo, P., Savary, B. J., Mercadante, D., Njo, M. F., Beeckman, T., Boudaoud, A., Gutierrez, L., … Lefebvre, V. (2024). Mutation of AtPME2, a pH-Dependent Pectin Methylesterase, Affects Cell Wall Structure and Hypocotyl Elongation. *Plant and Cell Physiology*, *65*(2), 301–318. https://doi.org/10.1093/pcp/pcad154

Hocq, L., Pelloux, J., & Lefebvre, V. (2017). Connecting Homogalacturonan-Type Pectin Remodeling to Acid Growth. In *Trends in Plant Science* (Vol. 22, Number 1, pp. 20–29). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.10.009

Hocq, L., Sénéchal, F., Lefebvre, V., Lehner, A., Domon, J. M., Mollet, J. C., Dehors, J., Pageau, K., Marcelo, P., Guérineau, F., Kolšek, K., Mercadante, D., & Pelloux, J. (2017). Combined experimental and computational approaches reveal distinct pH dependence of pectin

Methylesterase Inhibitors. *Plant Physiology*, *173*(2), 1075–1093. https://doi.org/10.1104/pp.16.01790

Hoffmann, B., Proust, H., Belcram, K., Labrune, C., Boyer, F. D., Rameau, C., & Bonhomme, S. (2014). Strigolactones inhibit caulonema elongation and cell division in the moss Physcomitrella patens. *PLoS ONE*, *9*(6). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099206

Hongo, S., Sato, K., Yokoyama, R., & Nishitani, K. (2012). Demethylesterification of the primary wall by PECTIN METHYLESTERASE35 provides mechanical support to the Arabidopsis stem. *Plant Cell*, *24*(6), 2624–2634. https://doi.org/10.1105/tpc.112.099325

Huang, J. H., Kortstee, A., Dees, D. C. T., Trindade, L. M., Schols, H. A., & Gruppen, H. (2016). Modification of potato cell wall pectin by the introduction of rhamnogalacturonan lyase and β-galactosidase transgenes and their side effects. *Carbohydrate Polymers*, *144*, 9–16. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.02.037

Huang, Y. C., Wu, H. C., Wang, Y. Da, Liu, C. H., Lin, C. C., Luo, D. L., & Jinn, T. L. (2017). PECTIN METHYLESTERASE34 contributes to heat tolerance through its role in promoting stomatal movement. *Plant Physiology*, *174*(2), 748–763. https://doi.org/10.1104/pp.17.00335

Ibar, C., & Orellana, A. (2007). The import of S-adenosylmethionine into the Golgi apparatus is required for the methylation of homogalacturonan. *Plant Physiology*, *145*(2), 504–512. https://doi.org/10.1104/pp.107.104679

Ileperuma, N. R., Marshall, S. D. G., Squire, C. J., Baker, H. M., Oakeshott, J. G., Russell, R. J., Plummer, K. M., Newcomb, R. D., & Baker, E. N. (2007). High-resolution crystal structure of plant carboxylesterase AeCXE1, from Actinidia eriantha, and its complex with a high-affinity inhibitor paraoxon. *Biochemistry*, *46*(7), 1851–1859. https://doi.org/10.1021/bi062046w

Invernizzi, M., Hanemian, M., Keller, J., Libourel, C., & Roby, D. (2022). PERKing up our understanding of the proline-rich extensin-like receptor kinases, a forgotten plant receptor kinase family. *New Phytologist*, *235*(3), 875–884. https://doi.org/10.1111/nph.18166

Ishida, K., & Yokoyama, R. (2022). Reconsidering the function of the xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase family. *Journal of Plant Research*, *135*(2), 145–156. https://doi.org/10.1007/s10265-021-01361-w

Ishii, T., & Matsunaga, T. (2000). *Pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II is covalently linked to homogalacturonan*. www.elsevier.com/locate/phytochem

Jarvis, M. C., Briggs, S. P. H., & Knox, J. P. (2003). Intercellular adhesion and cell separation in plants. In *Plant, Cell and Environment* (Vol. 26, Number 7, pp. 977–989). https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2003.01034.x

Jensen, J. K., Schultink, A., Keegstra, K., Wilkerson, C. G., & Pauly, M. (2012). RNA-seq analysis of developing nasturtium seeds (Tropaeolum majus): Identification and characterization of an additional galactosyltransferase involved in xyloglucan biosynthesis. *Molecular Plant*, *5*(5), 984–992. https://doi.org/10.1093/mp/sss032

Jensen, J. K., Sørensen, S. O., Harholt, J., Geshi, N., Sakuragi, Y., Møller, I., Zandleven, J., Bernal, A. J., Jensen, N. B., Sørensen, C., Pauly, M., Beldman, G., Willats, W. G. T., & Scheller, H. V. (2008). Identification of a xylogalacturonan xylosyltransferase involved in pectin biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell*, *20*(5), 1289–1302. https://doi.org/10.1105/tpc.107.050906

Jeong Hong, M., Yeon Kim, D., Geon Lee, T., Bae Jeon, W., & Weon Seo, Y. (2010). Functional characterization of pectin methylesterase inhibitor (PMEI) in wheat. In *Genes Genet. Syst*. http://rice.plantbiology.msu.edu/

Jiao, X., Li, F., Zhao, J., Wei, Y., Zhang, L., Yu, W., & Li, Q. (2023). The Preparation and Potential Bioactivities of Modified Pectins: A Review. In *Foods* (Vol. 12, Number 5). MDPI. https://doi.org/10.3390/foods12051016

Jiménez-Bermúdez, S., Redondo-Nevado, J., Muñoz-Blanco, J., Caballero, J. L., López-Aranda, J. M., Valpuesta, V., Pliego-Alfaro, F., Quesada, M. A., & Mercado, J. A. (2002). Manipulation of strawberry fruit softening by antisense expression of a pectate lyase gene. *Plant Physiology*, *128*(2), 751–759. https://doi.org/10.1104/pp.010671

Jobert, F., Soriano, A., Brottier, L., Casset, C., Divol, F., Safran, J., Lefebvre, V., Pelloux, J., Robert, S. and Péret, B. (2022), Auxin triggers pectin modification during rootlet emergence in white lupin. Plant J, 112: 1127-1140. https://doi.org/10.1111/tpj.15993

Johansson, K., El-Ahmad aYb, M., Friemann, R., Jo rnvall, H., Markovic, O., & Eklund aYÃ, H. (2002). *Crystal structure of plant pectin methylesterase*.

Jolie, R. P., Duvetter, T., Van Loey, A. M., & Hendrickx, M. E. (2010). Pectin methylesterase and its proteinaceous inhibitor: A review. In *Carbohydrate Research* (Vol. 345, Number 18, pp. 2583–2595). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.carres.2010.10.002

Jonsson, K., Lathe, R. S., Kierzkowski, D., Routier-Kierzkowska, A. L., Hamant, O., & Bhalerao, R. P. (2021). Mechanochemical feedback mediates tissue bending required for seedling emergence. *Current Biology*, *31*(6), 1154-1164.e3. https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.12.016

Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., … Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, *596*(7873), 583–589. https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2

Kaczmarska, A., Pieczywek, P. M., Cybulska, J., & Zdunek, A. (2022). Structure and functionality of Rhamnogalacturonan I in the cell wall and in solution: A review. In *Carbohydrate Polymers* (Vol. 278). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118909

Kakugawa, S., Langton, P. F., Zebisch, M., Howell, S. A., Chang, T. H., Liu, Y., Feizi, T., Bineva, G., O'Reilly, N., Snijders, A. P., Jones, E. Y., & Vincent, J. P. (2015). Notum deacylates Wnt proteins to suppress signalling activity. *Nature*, *519*(7542), 187–192. https://doi.org/10.1038/nature14259

Kalunke, R. M., Tundo, S., Benedetti, M., Cervone, F., De Lorenzo, G., & D'Ovidio, R. (2015). An update on polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP), aleucine-rich repeat protein that protects crop plants against pathogens. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 6, Number MAR). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00146

Kamisugi, Y., Cuming, A. C., & Cove, D. J. (2005). Parameters determining the efficiency of gene targeting in the moss Physcomitrella patens. *Nucleic Acids Research*, *33*(19), 1–10. https://doi.org/10.1093/nar/gni172

Kamisugi, Y., Schlink, K., Rensing, S. A., Schween, G., von Stackelberg, M., Cuming, A. C., Reski, R., & Cove, D. J. (2006). The mechanism of gene targeting in Physcomitrella patens: Homologous recombination, concatenation and multiple integration. *Nucleic Acids Research*, *34*(21), 6205–6214. https://doi.org/10.1093/nar/gkl832

Kang, X., Kirui, A., Dickwella Widanage, M. C., Mentink-Vigier, F., Cosgrove, D. J., & Wang, T. (2019). Lignin-polysaccharide interactions in plant secondary cell walls revealed by solid-state NMR. *Nature Communications*, *10*(1). https://doi.org/10.1038/s41467-018-08252-0

Karen S. Renzaglia, & David J. Garbary. (2001). Motile Gametes of Land Plants: Diversity, Development, and Evolution. *Critical Reviews in Plant Sciences*, *20*(2), 107–213.

Kim, J., Shiu, S. H., Thoma, S., Li, W. H., & Patterson, S. E. (2006). Patterns of expansion and expression divergence in the plant polygalacturonase gene family. *Genome Biology*, *7*(9). https://doi.org/10.1186/gb-2006-7-9-r87

Kim, K., Ryu, B. H., Kim, S. S., An, D. R., Ngo, T. D., Pandian, R., Kim, K. K., & Kim, T. D. (2015). Structural and biochemical characterization of a carbohydrate acetylesterase from Sinorhizobium meliloti 1021. *FEBS Letters*, *589*(1), 117–122. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.11.033

Kim, S. J., Held, M. A., Zemelis, S., Wilkerson, C., & Brandizzi, F. (2015). CGR2 and CGR3 have critical overlapping roles in pectin methylesterification and plant growth in Arabidopsis thaliana. *Plant Journal*, *82*(2), 208–220. https://doi.org/10.1111/tpj.12802

Kim, Y. J., Jeong, H. Y., Kang, S. Y., Silva, J., Kim, E. J., Park, S. K., Jung, K. H., & Lee, C. (2020). Physiological importance of pectin modifying genes during rice pollen development. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(14), 1–16. https://doi.org/10.3390/ijms21144840

Kobayashi, M., Kouzu, N., Inami, A., Toyooka, K., Konishi, Y., Matsuoka, K., & Matoh, T. (2011). Characterization of arabidopsis CTP:3-deoxy-d-manno-2-octulosonate cytidylyltransferase (CMP-KDO synthetase), the enzyme that activates KDO during rhamnogalacturonan II biosynthesis. *Plant and Cell Physiology*, *52*(10), 1832–1843. https://doi.org/10.1093/pcp/pcr120

Kohorn, B. D. (2016). Cell wall-associated kinases and pectin perception. In *Journal of Experimental Botany* (Vol. 67, Number 2, pp. 489–494). Oxford University Press. https://doi.org/10.1093/jxb/erv467

Kolenová, K., Vršanská, M., & Biely, P. (2006). Mode of action of endo-β-1,4-xylanases of families 10 and 11 on acidic xylooligosaccharides. *Journal of Biotechnology*, *121*(3), 338–345. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.08.001

Kosetsu, K., Murata, T., Yamada, M., Nishina, M., Boruc, J., Hasebe, M., Van Damme, D., & Goshima, G. (2017). Cytoplasmic MTOCs control spindle orientation for asymmetric cell division in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(42), E8847–E8854. https://doi.org/10.1073/pnas.1713925114

Kubalová M, Kampová A, Vosolsobě S, Raabe K, Simonaviciene B, Benitez-Alfonso Y, Müller K, Medvecká E, Fendrych M. Polygalacturonases regulated by auxin facilitate root cell elongation in Arabidopsis thaliana via pectin remodeling. bioRxiv. 2025. doi:10.1101/2025.05.07.652666

Kuivanen, J., Biz, A., & Richard, P. (2019). Microbial hexuronate catabolism in biotechnology. In *AMB Express* (Vol. 9, Number 1). Springer Verlag. https://doi.org/10.1186/s13568-019-0737-1

Kulkarni, A. R., Peña, M. J., Avci, U., Mazumder, K., Urbanowicz, B. R., Pattathil, S., Yin, Y., O'Neill, M. A., Roberts, A. W., Hahn, M. G., Xu, Y., Darvill, A. G., & York, W. S. (2012). The ability of land plants to synthesize glucuronoxylans predates the evolution of tracheophytes. *Glycobiology*, *22*(3), 439–451. https://doi.org/10.1093/glycob/cwr117

Kuluev, B. R., Knyazev, A. V., Nikonorov, Y. M., & Chemeris, A. V. (2014). Role of the expansin genes NtEXPA1 and NtEXPA4 in the regulation of cell extension during tobacco leaf growth. *Russian Journal of Genetics*, *50*(5), 489–497. https://doi.org/10.1134/S1022795414040061

Landberg, K., Pederson, E. R. A., Viaene, T., Bozorg, B., Friml, J., Jönsson, H., Thelander, M., & Sundberg, E. (2013). The moss physcomitrella patens reproductive organ development is highly organized, affected by the two SHI/STY genes and by the level of active auxin in the SHI/STY expression domain. *Plant Physiology*, *162*(3), 1406–1419. https://doi.org/10.1104/pp.113.214023

Lang, D., Ullrich, K. K., Murat, F., Fuchs, J., Jenkins, J., Haas, F. B., Piednoel, M., Gundlach, H., Van Bel, M., Meyberg, R., Vives, C., Morata, J., Symeonidi, A., Hiss, M., Muchero, W., Kamisugi, Y., Saleh, O., Blanc, G., Decker, E. L., … Rensing, S. A. (2018). The Physcomitrella patens

chromosome-scale assembly reveals moss genome structure and evolution. *Plant Journal*, *93*(3), 515–533. https://doi.org/10.1111/tpj.13801

Lee, K. J. D., Marcus, S. E., & Knox, J. P. (2011). Cell wall biology: Perspectives from cell wall imaging. *Molecular Plant*, *4*(2), 212–219. https://doi.org/10.1093/mp/ssq075

Le Gall, H., Philippe, F., Domon, J. M., Gillet, F., Pelloux, J., & Rayon, C. (2015). Cell wall metabolism in response to abiotic stress. In *Plants* (Vol. 4, Number 1, pp. 112–166). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/plants4010112

Lemaire, A., Duran-Garzon, C., Rigaud, S., Trezel, P., Habrylo, O., Safran, J., Voxeur, A., Roulard, R., Miternique, J., Fontaine, J. X., Molinié, R., Guillaume, A., Levavasseur, L., Lefebvre, V., Pilard, S., Pelloux, J., & Pau-Roblot, C. (2025). Rhamnogalacturonan-I oligogalacturonide profiling, a tool to elucidate the mode of action of RGI-degrading enzymes and RGI structure. *Carbohydrate Polymers*, *366*. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2025.123894

L'Enfant, M., Domon, J. M., Rayon, C., Desnos, T., Ralet, M. C., Bonnin, E., Pelloux, J., & Pau-Roblot, C. (2015). Substrate specificity of plant and fungi pectin methylesterases: Identification of novel inhibitors of PMEs. *International Journal of Biological Macromolecules*, *81*, 681–691. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.08.066

Leszczuk, A., Kalaitzis, P., Kulik, J., & Zdunek, A. (2023). Review: structure and modifications of arabinogalactan proteins (AGPs). In *BMC Plant Biology* (Vol. 23, Number 1). BioMed Central Ltd. https://doi.org/10.1186/s12870-023-04066-5

Levesque-Tremblay, G., Pelloux, J., Braybrook, S. A., & Müller, K. (2015). Tuning of pectin methylesterification: consequences for cell wall biomechanics and development. In *Planta* (Vol. 242, Number 4, pp. 791–811). Springer Verlag. https://doi.org/10.1007/s00425-015-2358-5

Lewis, K. C., Selzer, T., Shahar, C., Udi, Y., Tworowski, D., & Sagi, I. (2008). Inhibition of pectin methyl esterase activity by green tea catechins. *Phytochemistry*, *69*(14), 2586–2592. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.08.012

Liao, H., Tang, R., Zhang, X., Luan, S., & Yu, F. (2017). FERONIA Receptor Kinase at the Crossroads of Hormone Signaling and Stress Responses. *Plant and Cell Physiology*, *58*(7), 1143–1150. https://doi.org/10.1093/pcp/pcx048

Li, C., Lu, H., Li, W., Yuan, M., & Fu, Y. (2017). A ROP2-RIC1 pathway fine-tunes microtubule reorganization for salt tolerance in Arabidopsis. *Plant Cell and Environment*, *40*(7), 1127–1142. https://doi.org/10.1111/pce.12905

Liepman, A. H., Nairn, C. J., Willats, W. G. T., Sørensen, I., Roberts, A. W., & Keegstra, K. (2007). Functional genomic analysis supports conservation of function among cellulose synthase-like a gene family members and suggests diverse roles of mannans in plants. *Plant Physiology*, *143*(4), 1881–1893. https://doi.org/10.1104/pp.106.093989

Li, J., Peng, C., Mao, A., Zhong, M., & Hu, Z. (2024). An overview of microbial enzymatic approaches for pectin degradation. In *International Journal of Biological Macromolecules* (Vol. 254). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.127804

Lin, W., Tang, W., Pan, X., Huang, A., Gao, X., Anderson, C. T., & Yang, Z. (2022). Arabidopsis pavement cell morphogenesis requires FERONIA binding to pectin for activation of ROP GTPase signaling. *Current Biology*, *32*(3), 497-507.e4. https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.11.030

Lionetti, V., Cervone, F., & Bellincampi, D. (2012). Methyl esterification of pectin plays a role during plant-pathogen interactions and affects plant resistance to diseases. *Journal of Plant Physiology*, *169*(16), 1623–1630. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.05.006

Lionetti, V., Raiola, A., Camardella, L., Giovane, A., Obel, N., Pauly, M., Favaron, F., Cervone, F., & Bellincampi, D. (2007). Overexpression of pectin methylesterase inhibitors in Arabidopsis restricts fungal infection by Botrytis cinerea. *Plant Physiology*, *143*(4), 1871–1880. https://doi.org/10.1104/pp.106.090803

Little, A., Schwerdt, J. G., Shirley, N. J., Khor, S. F., Neumann, K., O'donovan, L. A., Lahnstein, J., Collins, H. M., Henderson, M., Fincher, G. B., & Burton, R. A. (2018). Revised phylogeny of the cellulose synthase gene superfamily: Insights into cell wall evolution. *Plant Physiology*, *177*(3), 1124–1141. https://doi.org/10.1104/pp.17.01718

Liu, S., Tian, L., Cong, Y., Shi, Q., Wang, Lianshun, Lu, Y., Wang, Li, & Yang, G. (2023). Recent advances in polygalacturonase: Industrial applications and challenges. In *Carbohydrate Research* (Vol. 528). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.carres.2023.108816

Liu, X., Cui, H., Zhang, B., Song, M., Chen, S., Xiao, C., Tang, Y., & Liesche, J. (2021). Reduced pectin content of cell walls prevents stress-induced root cell elongation in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, *72*(4), 1073–1084. https://doi.org/10.1093/jxb/eraa533

Liu, X. L., Liu, L., Niu, Q. K., Xia, C., Yang, K. Z., Li, R., Chen, L. Q., Zhang, X. Q., Zhou, Y., & Ye, D. (2011). MALE GAMETOPHYTE DEFECTIVE 4 encodes a rhamnogalacturonan II xylosyltransferase and is important for growth of pollen tubes and roots in Arabidopsis. *Plant Journal*, *65*(4), 647–660. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04452.x

Liu, Y., Budke, J. M., & Goffinet, B. (2012). Phylogenetic inference rejects sporophyte based classification of the Funariaceae (Bryophyta): Rapid radiation suggests rampant homoplasy in sporophyte evolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *62*(1), 130–145. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.09.010

Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M., & Henrissat, B. (2014a). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research*, *42*(D1). https://doi.org/10.1093/nar/gkt1178

Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M., & Henrissat, B. (2014b). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research*, *42*(D1). https://doi.org/10.1093/nar/gkt1178

Lopez-Obando, M., Guillory, A., Boyer, F. D., Cornu, D., Hoffmann, B., Le Bris, P., Pouvreau, J. B., Delavault, P., Rameau, C., de Saint Germain, A., & Bonhomme, S. (2021). The Physcomitrium (Physcomitrella) patens PpKAI2L receptors for strigolactones and related compounds function via MAX2-dependent and -independent pathways. *Plant Cell*, *33*(11), 3487–3512. https://doi.org/10.1093/plcell/koab217

Lopez-Sanchez, P., Cersosimo, J., Wang, D., Flanagan, B., Stokes, J. R., & Gidley, M. J. (2015). Poroelastic mechanical effects of hemicelluloses on cellulosic hydrogels under compression. *PLoS ONE*, *10*(3). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122132

Lubini, G., Ferreira, P. B., Quiapim, A. C., Brito, M. S., Cossalter, V., Pranchevicius, M. C. S., & Goldman, M. H. S. (2023). Silencing of a Pectin Acetylesterase (PAE) Gene Highly Expressed in Tobacco Pistils Negatively Affects Pollen Tube Growth. *Plants*, *12*(2). https://doi.org/10.3390/plants12020329

Madrid Liwanag, A. J., Ebert, B., Verhertbruggen, Y., Rennie, E. A., Rautengarten, C., Oikawa, A., Andersen, M. C. F., Clausen, M. H., & Scheller, H. V. (2013). Pectin biosynthesis: GALS1 in Arabidopsis thaliana Is a β-1,4-Galactan β-1,4-Galactosyltransferase. *Plant Cell*, *24*(12), 5024–5036. https://doi.org/10.1105/tpc.112.106625

Ma, G., Zhu, W., & Liu, Y. (2016). QM/MM studies on the calcium-assisted β-elimination mechanism of pectate lyase from bacillus subtilis. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, *84*(11), 1606–1615. https://doi.org/10.1002/prot.25103

Manmohit Kalia, P. K. (2015). Pectin Methylesterases: A Review. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, *05*(05). https://doi.org/10.4172/2155-9821.1000227

Marcus, S. E., Verhertbruggen, Y., Hervé, C., Ordaz-Ortiz, J. J., Farkas, V., Pedersen, H. L., Willats, W. G., & Knox, J. P. (2008). Pectic homogalacturonan masks abundant sets of xyloglucan epitopes in plant cell walls. *BMC Plant Biology*, *8*. https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-60

Marín-Rodríguez, M. C., Smith, D. L., Manning, K., Orchard, J., & Seymour, G. B. (2003). Pectate lyase gene expression and enzyme activity in ripening banana fruit. In *Plant Molecular Biology* (Vol. 51).

Maris, A., Suslov, D., Fry, S. C., Verbelen, J. P., & Vissenberg, K. (2009). Enzymic characterization of two recombinant xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (XTH) proteins of Arabidopsis and their effect on root growth and cell wall extension. *Journal of Experimental Botany*, *60*(13), 3959–3972. https://doi.org/10.1093/jxb/erp229

Markovič, O., & Janeček, Š. (2004). Pectin methylesterases: Sequence-structural features and phylogenetic relationships. *Carbohydrate Research*, *339*(13), 2281–2295. https://doi.org/10.1016/j.carres.2004.06.023

Matsunaga, T., Ishii, T., Matsumoto, S., Higuchi, M., Darvill, A., Albersheim, P., & O'Neill, M. A. (2004). Occurrence of the Primary Cell Wall Polysaccharide Rhamnogalacturonan II in Pteridophytes, Lycophytes, and Bryophytes. Implications for the Evolution of Vascular Plants. *Plant Physiology*, *134*(1), 339–351. https://doi.org/10.1104/pp.103.030072

Matteo, A. Di, Federici, L., Mattei, B., Salvi, G., Johnson, K. A., Savino, C., De Lorenzo, G., Tsernoglou, D., & Cervone, F. (2003). *The crystal structure of polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP), a leucine-rich repeat protein involved in plant defense*. https://doi.org/https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1733690100

Ma, Y., & Johnson, K. (2023). Arabinogalactan proteins – Multifunctional glycoproteins of the plant cell wall. In *The Cell Surface* (Vol. 9). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.tcsw.2023.100102

McCarthy, T. W., Der, J. P., Honaas, L. A., dePamphilis, C. W., & Anderson, C. T. (2014). Phylogenetic analysis of pectin-related gene families in Physcomitrella patens and nine other plant species yields evolutionary insights into cell walls. *BMC Plant Biology*, *14*(1). https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-79

McFarlane, H. E., Watanabe, Y., Gendre, D., Carruthers, K., Levesque-Tremblay, G., Haughn, G. W., Bhalerao, R. P., & Samuels, L. (2013). Cell wall polysaccharides are mislocalized to the vacuole in echidna Mutants. *Plant and Cell Physiology*, *54*(11), 1867–1880. https://doi.org/10.1093/pcp/pct129

Medina, R., Johnson, M. G., Liu, Y., Wickett, N. J., Shaw, A. J., & Goffinet, B. (2019). Phylogenomic delineation of Physcomitrium (Bryophyta: Funariaceae) based on targeted sequencing of nuclear exons and their flanking regions rejects the retention of Physcomitrella, Physcomitridium and Aphanorrhegma. *Journal of Systematics and Evolution*, *57*(4), 404–417. https://doi.org/10.1111/jse.12516

Medina, R., Johnson, M., Liu, Y., Wilding, N., Hedderson, T. A., Wickett, N., & Goffinet, B. (2018). Evolutionary dynamism in bryophytes: Phylogenomic inferences confirm rapid radiation in the moss family Funariaceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *120*, 240–247. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2017.12.002

Medina, R., Liu, Y., Li-Song, W., Shuiliang, G., Hylander, K., & Goffinet, B. (2015). DNA based revised geographic circumscription of species of Physcomitrella s.l. (Funariaceae): P. patens new to East Asia and P. magdalenae new to East Africa. *Bryologist*, *118*(1), 22–31. https://doi.org/10.1639/0007-2745-118.1.022

Melelli, A., Arnould, O., Beaugrand, J., & Bourmaud, A. (2020). The middle lamella of plant fibers used as composite reinforcement: Investigation by atomic force microscopy. *Molecules*, *25*(3). https://doi.org/10.3390/molecules25030632

Mélida, H., Bacete, L., Ruprecht, C., Rebaque, D., del Hierro, I., López, G., Brunner, F., Pfrengle, F., & Molina, A. (2020). Arabinoxylan-Oligosaccharides Act as Damage Associated Molecular Patterns in Plants Regulating Disease Resistance. *Frontiers in Plant Science*, *11*. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01210

Mellerowicz, E. J., & Sundberg, B. (2008). Wood cell walls: biosynthesis, developmental dynamics and their implications for wood properties. In *Current Opinion in Plant Biology* (Vol. 11, Number 3, pp. 293–300). https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.03.003

Méndez-Yañez, Á., Beltrán, D., Campano-Romero, C., Molinett, S., Herrera, R., Moya-León, M. A., & Morales-Quintana, L. (2017). Glycosylation is important for FcXTH1 activity as judged by its structural and biochemical characterization. *Plant Physiology and Biochemistry*, *119*, 200–210. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.08.030

Mercadante, D., Melton, L. D., Jameson, G. B., Williams, M. A. K., & De Simone, A. (2013). Substrate dynamics in enzyme action: Rotations of monosaccharide subunits in the binding groove are essential for pectin methylesterase processivity. *Biophysical Journal*, *104*(8), 1731–1739. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.02.049

Merkouropoulos, G., & Shirsat, A. H. (2003). The unusual Arabidopsis extensin gene atExt1 is expressed throughout plant development and is induced by a variety of biotic and abiotic stresses. *Planta*, *217*(3), 356–366. https://doi.org/10.1007/s00425-003-1002-y

Micheli, F. (2001). *Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology*. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1360-1385(01)02045-3

Mierczyńska, J., Cybulska, J., Sołowiej, B., & Zdunek, A. (2015). Effect of Ca2+, Fe2+ and Mg2+ on rheological properties of new food matrix made of modified cell wall polysaccharides from apple. *Carbohydrate Polymers*, *133*, 547–555. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.07.046

Milani, P., Gholamirad, M., Traas, J., Arnéodo, A., Boudaoud, A., Argoul, F., & Hamant, O. (2011). In vivo analysis of local wall stiffness at the shoot apical meristem in Arabidopsis using atomic force microscopy. *Plant Journal*, *67*(6), 1116–1123. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04649.x

Mishler-Elmore, J. W., Zhou, Y., Sukul, A., Oblak, M., Tan, L., Faik, A., & Held, M. A. (2021). Extensins: Self-Assembly, Crosslinking, and the Role of Peroxidases. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fpls.2021.664738

Mohanasundaram, B., & Pandey, S. (2022). Effect of environmental signals on growth and development in mosses. In *Journal of Experimental Botany* (Vol. 73, Number 13, pp. 4514–4527). Oxford University Press. https://doi.org/10.1093/jxb/erac138

Mohnen, D. (2008). Pectin structure and biosynthesis. In *Current Opinion in Plant Biology* (Vol. 11, Number 3, pp. 266–277). https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.03.006

Mølgaard, A., Kauppinen, S., & Larsen, S. (2000). *Rhamnogalacturonan acetylesterase elucidates the structure and function of a new family of hydrolases*.

Moller, I., Sørensen, I., Bernal, A. J., Blaukopf, C., Lee, K., Øbro, J., Pettolino, F., Roberts, A., Mikkelsen, J. D., Knox, J. P., Bacic, A., & Willats, W. G. T. (2007). High-throughput mapping of cell-wall polymers within and between plants using novel microarrays. *Plant Journal*, *50*(6), 1118–1128. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03114.x

Moody, L. A. (2019). The 2D to 3D growth transition in the moss Physcomitrella patens. In *Current Opinion in Plant Biology* (Vol. 47, pp. 88–95). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2018.10.001

Moody, L. A., Kelly, S., Rabbinowitsch, E., & Langdale, J. A. (2018). Genetic Regulation of the 2D to 3D Growth Transition in the Moss Physcomitrella patens. *Current Biology*, *28*(3), 473-478.e5. https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.12.052

Mortimer, J. C., Miles, G. P., Brown, D. M., Zhang, Z., Segura, M. P., Weimar, T., Yu, X., Seffen, K. A., Stephens, E., Turner, S. R., & Dupree, P. (2010). Absence of branches from xylan in Arabidopsis gux mutants reveals potential for simplification of lignocellulosic biomass. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(40), 17409–17414. https://doi.org/10.1073/pnas.1005456107

Naramoto, S., Hata, Y., Fujita, T., & Kyozuka, J. (2022). The bryophytes Physcomitrium patens and Marchantia polymorpha as model systems for studying evolutionary cell and developmental biology in plants. In *Plant Cell* (Vol. 34, Number 1, pp. 228–246). Oxford University Press. https://doi.org/10.1093/plcell/koab218

Ndeh, D., Rogowski, A., Cartmell, A., Luis, A. S., Baslé, A., Gray, J., Venditto, I., Briggs, J., Zhang, X., Labourel, A., Terrapon, N., Buffetto, F., Nepogodiev, S., Xiao, Y., Field, R. A., Zhu, Y., O'Neill, M. A., Urbanowicz, B. R., York, W. S., … Gilbert, H. J. (2017). Complex pectin metabolism by gut bacteria reveals novel catalytic functions. *Nature*, *544*(7648), 65–70. https://doi.org/10.1038/nature21725

Ngouémazong, D. E., Tengweh, F. F., Fraeye, I., Duvetter, T., Cardinaels, R., Van Loey, A., Moldenaers, P., & Hendrickx, M. (2012). Effect of de-methylesterification on network development and nature of Ca2+-pectin gels: Towards understanding structure-function relations of pectin. *Food Hydrocolloids*, *26*(1), 89–98. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.04.002

Nguyen, H. P., Jeong, H. Y., Jeon, S. H., Kim, D., & Lee, C. (2017). Rice pectin methylesterase inhibitor28 (OsPMEI28) encodes a functional PMEI and its overexpression results in a dwarf phenotype through increased pectin methylesterification levels. *Journal of Plant Physiology*, *208*, 17–25. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.11.006

Ninkuu, V., Yan, J., Fu, Z., Yang, T., Ziemah, J., Ullrich, M. S., Kuhnert, N., & Zeng, H. (2023). Lignin and Its Pathway-Associated Phytoalexins Modulate Plant Defense against Fungi. In *Journal of Fungi* (Vol. 9, Number 1). MDPI. https://doi.org/10.3390/jof9010052

Nishiyama, Y. (2009). Structure and properties of the cellulose microfibril. In *Journal of Wood Science* (Vol. 55, Number 4, pp. 241–249). Springer Japan. https://doi.org/10.1007/s10086-009-1029-1

Norris, J. H., Li, X., Huang, S., Van De Meene, A. M. L., Tran, M. L., Killeavy, E., Chaves, A. M., Mallon, B., Mercure, D., Tan, H. T., Burton, R. A., Doblin, M. S., Kim, S. H., & Roberts, A. W. (2017). Functional specialization of cellulose synthase isoforms in a moss shows parallels with seed plants. *Plant Physiology*, *175*(1), 210–222. https://doi.org/10.1104/pp.17.00885

Oosterveld, A., Beldman, G., Searle-Van Leeuwen, M. J. F., & Voragen, A. G. J. (2000). Effect of enzymatic deacetylation on gelation of sugar beet pectin in the presence of calcium. *Carbohydrate Polymers*, *43*(3), 249–256. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0144-8617(00)00174-0

Ozawa, T., Takeshita, M., Negishi, O., & Imagawa, H. (1993). *Pollen Tube Growth Promoters from the Style of Rhododendron mucronatum G. Don*. https://doi.org/https://doi.org/10.1271/bbb.57.2122

Palusa, S. G., Golovkin, M., Shin, S. B., Richardson, D. N., & Reddy, A. S. N. (2007). Organ-specific, developmental, hormonal and stress regulation of expression of putative pectate lyase genes in Arabidopsis. *New Phytologist*, *174*(3), 537–550. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02033.x

Pandeirada, C. O., Achterweust, M., Janssen, H. G., Westphal, Y., & Schols, H. A. (2022). Periodate oxidation of plant polysaccharides provides polysaccharide-specific oligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*, *291*. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119540

Pan, L., Zhang, Y., Zhang, F., Wang, Z., & Zheng, J. (2023). α-l-rhamnosidase: production, properties, and applications. In *World Journal of Microbiology and Biotechnology* (Vol. 39, Number 7). Springer Science and Business Media B.V. https://doi.org/10.1007/s11274-023-03638-9

Panter, P. E., Kent, O., Dale, M., Smith, S. J., Skipsey, M., Thorlby, G., Cummins, I., Ramsay, N., Begum, R. A., Sanhueza, D., Fry, S. C., Knight, M. R., & Knight, H. (2019). MUR1-mediated cell-wall fucosylation is required for freezing tolerance in Arabidopsis thaliana. *New Phytologist*, *224*(4), 1518–1531. https://doi.org/10.1111/nph.16209

Panter, P. E., Seifert, J., Dale, M., Pridgeon, A. J., Hulme, R., Ramsay, N., Contera, S., & Knight, H. (2023). Cell wall fucosylation in Arabidopsis influences control of leaf water loss and alters stomatal development and mechanical properties. *Journal of Experimental Botany*, *74*(8), 2680–2691. https://doi.org/10.1093/jxb/erad039

Pauly, M., Gille, S., Liu, L., Mansoori, N., de Souza, A., Schultink, A., & Xiong, G. (2013). Hemicellulose biosynthesis. In *Planta* (Vol. 238, Number 4, pp. 627–642). https://doi.org/10.1007/s00425-013-1921-1

Peaucelle, A., Braybrook, S. A., Le Guillou, L., Bron, E., Kuhlemeier, C., & Höfte, H. (2011). Pectin-induced changes in cell wall mechanics underlie organ initiation in Arabidopsis. *Current Biology*, *21*(20), 1720–1726. https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.08.057

Peaucelle, A., Braybrook, S., & Höfte, H. (2012). Cell wall mechanics and growth control in plants: The role of pectins revisited. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 3, Number JUN). Frontiers Research Foundation. https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00121

Peaucelle, A., Louvet, R., Johansen, J. N., Höfte, H., Laufs, P., Pelloux, J., & Mouille, G. (2008). Arabidopsis Phyllotaxis Is Controlled by the Methyl-Esterification Status of Cell-Wall Pectins. *Current Biology*, *18*(24), 1943–1948. https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.10.065

Peaucelle, A., Wightman, R., & Höfte, H. (2015). The Control of Growth Symmetry Breaking in the Arabidopsis Hypocotyl. *Current Biology*, *25*(13), 1746–1752. https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.05.022

Pelletier, S., Van Orden, J., Wolf, S., Vissenberg, K., Delacourt, J., Ndong, Y. A., Pelloux, J., Bischoff, V., Urbain, A., Mouille, G., Lemonnier, G., Renou, J. P., & Höfte, H. (2010). A role for pectin de-methylesterification in a developmentally regulated growth acceleration in dark-grown Arabidopsis hypocotyls. *New Phytologist*, *188*(3), 726–739. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03409.x

Pelloux, J., Rustérucci, C., & Mellerowicz, E. J. (2007). New insights into pectin methylesterase structure and function. In *Trends in Plant Science* (Vol. 12, Number 6, pp. 267–277). https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.04.001

Peña, M. J., Darvill, A. G., Eberhard, S., York, W. S., & O'Neill, M. A. (2008). Moss and liverwort xyloglucans contain galacturonic acid and are structurally distinct from the xyloglucans synthesized by hornworts and vascular plants. *Glycobiology*, *18*(11), 891–904. https://doi.org/10.1093/glycob/cwn078

Pérez, S., Rodríguez-Carvajal, M. A., & Doco, T. (2003). *A complex plant cell wall polysaccharide: rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function*. www.elsevier.com/locate/biochi

Perroud, P. F., Haas, F. B., Hiss, M., Ullrich, K. K., Alboresi, A., Amirebrahimi, M., Barry, K., Bassi, R., Bonhomme, S., Chen, H., Coates, J. C., Fujita, T., Guyon-Debast, A., Lang, D., Lin, J., Lipzen, A., Nogué, F., Oliver, M. J., Ponce de León, I., … Rensing, S. A. (2018). The Physcomitrella patens gene atlas project: large-scale RNA-seq based expression data. *Plant Journal*, *95*(1), 168–182. https://doi.org/10.1111/tpj.13940

Philippe, F., Pelloux, J., & Rayon, C. (2017a). Plant pectin acetylesterase structure and function: New insights from bioinformatic analysis. *BMC Genomics*, *18*(1). https://doi.org/10.1186/s12864-017-3833-0

Philippe, F., Pelloux, J., & Rayon, C. (2017b). Plant pectin acetylesterase structure and function: New insights from bioinformatic analysis. *BMC Genomics*, *18*(1). https://doi.org/10.1186/s12864-017-3833-0

Rautengarten, C., Ebert, B., Herter, T., Petzold, C. J., Ishii, T., Mukhopadhyay, A., Usadel, B., & Scheller, H. V. (2011). The interconversion of UDP-arabinopyranose and UDP-arabinofuranose is indispensable for plant development in Arabidopsis. *Plant Cell*, *23*(4), 1373–1390. https://doi.org/10.1105/tpc.111.083931

Reboul, R., Geserick, C., Pabst, M., Frey, B., Wittmann, D., Lütz-Meindl, U., Léonard, R., & Tenhaken, R. (2011). Down-regulation of UDP-glucuronic acid biosynthesis leads to swollen plant cell walls and severe developmental defects associated with changes in pectic polysaccharides. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(46), 39982–39992. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.255695

Regmi, K. C., Li, L., & Gaxiola, R. A. (2017). Alternate modes of photosynthate transport in the alternating generations of physcomitrella patens. *Frontiers in Plant Science*, *8*. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01956

Rensing, S. A. (2016). (Why) Does Evolution Favour Embryogenesis? In *Trends in Plant Science* (Vol. 21, Number 7, pp. 562–573). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.02.004

Rensing, S. A., Goffinet, B., Meyberg, R., Wu, S. Z., & Bezanilla, M. (2020). The moss physcomitrium (Physcomitrella) patens: A model organism for non-seed plants. In *Plant Cell* (Vol. 32, Number 5, pp. 1361–1376). American Society of Plant Biologists. https://doi.org/10.1105/tpc.19.00828

Rhee, S. Y., Osborne, E., Poindexter, P. D., & Somerville, C. R. (2003). Microspore Separation in the quartet 3 Mutants of Arabidopsis Is Impaired by a Defect in a Developmentally Regulated Polygalacturonase Required for Pollen Mother Cell Wall Degradation. *Plant Physiology*, *133*(3), 1170–1180. https://doi.org/10.1104/pp.103.028266

Richardt, S., Timmerhaus, G., Lang, D., Qudeimat, E., Corrêa, L. G. G., Reski, R., Rensing, S. A., & Frank, W. (2010). Microarray analysis of the moss Physcomitrella patens reveals evolutionarily conserved transcriptional regulation of salt stress and abscisic acid signalling. *Plant Molecular Biology*, *72*(1–2), 27–45. https://doi.org/10.1007/s11103-009-9550-6

Roberts, A. W., Lahnstein, J., Hsieh, Y. S. Y., Xing, X., Yap, K., Chaves, A. M., Scavuzzo-Duggan, T. R., Dimitroff, G., Lonsdale, A., Roberts, E., Bulone, V., Fincher, G. B., Doblin, M. S., Bacic, A., & Burton, R. A. (2018). Functional characterization of a glycosyltransferase from the moss physcomitrella patens involved in the biosynthesis of a novel cell wall arabinoglucan. *Plant Cell*, *30*(6), 1293–1308. https://doi.org/10.1105/tpc.18.00082

Röckel, N., Wolf, S., Kost, B., Rausch, T., & Greiner, S. (2008). Elaborate spatial patterning of cell-wall PME and PMEI at the pollen tube tip involves PMEI endocytosis, and reflects the distribution of esterified and de-esterified pectins. *Plant Journal*, *53*(1), 133–143. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03325.x

Rodrigues Mota, T., Matias de Oliveira, D., Marchiosi, R., Ferrarese-Filho, O., & Dantas dos Santos, W. (2018). Plant cell wall composition and enzymatic deconstruction. *AIMS Bioengineering*, *5*(1), 63–77. https://doi.org/10.3934/bioeng.2018.1.63

Round, A. N., Rigby, N. M., MacDougall, A. J., & Morris, V. J. (2010). A new view of pectin structure revealed by acid hydrolysis and atomic force microscopy. *Carbohydrate Research*, *345*(4), 487–497. https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.12.019

Rui, Y., Xiao, C., Yi, H., Kandemir, B., Wang, J. Z., Puri, V. M., & Anderson, C. T. (2017). POLYGALACTURONASE INVOLVED IN EXPANSION3 functions in seedling development, rosette growth, and stomatal dynamics in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell*, *29*(10), 2413–2432. https://doi.org/10.1105/tpc.17.00568

Saez-Aguayo, S., & Largo-Gosens, A. (2022). Rhamnogalacturonan-I forms mucilage: Behind its simplicity, a cutting-edge organization. *Journal of Experimental Botany*, *73*(11), 3299–3303. https://doi.org/10.1093/jxb/erac094

Saez-Aguayo, S., Ralet, M. C., Berger, A., Botran, L., Ropartz, D., Marion-Poll, A., & Northa, H. M. (2013). PECTIN METHYLESTERASE INHIBITOR6 promotes Arabidopsis mucilage release by limiting methylesterification of homogalacturonan in seed coat epidermal cells. *Plant Cell*, *25*(1), 308–323. https://doi.org/10.1105/tpc.112.106575

Safran, J., Habrylo, O., Cherkaoui, M., Lecomte, S., Voxeur, A., Pilard, S., Bassard, S., Pau-Roblot, C., Mercadante, D., Pelloux, J., & Sénéchal, F. (2021). New insights into the specificity and processivity of two novel pectinases from Verticillium dahliae. *International Journal of Biological Macromolecules*, *176*, 165–176. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.035

Safran, J., Tabi, W., Ung, V., Lemaire, A., Habrylo, O., Bouckaert, J., Rouffle, M., Voxeur, A., Pongrac, P., Bassard, S., Molinié, R., Fontaine, J. X., Pilard, S., Pau-Roblot, C., Bonnin, E., Larsen, D. S., Morel-Rouhier, M., Girardet, J. M., Lefebvre, V., … Pelloux, J. (2023). Plant polygalacturonase structures specify enzyme dynamics and processivities to fine-tune cell wall pectins. *Plant Cell*, *35*(8), 3073–3091. https://doi.org/10.1093/plcell/koad134

Scheible, W. R., & Pauly, M. (2004). Glycosyltransferases and cell wall biosynthesis: Novel players and insights. In *Current Opinion in Plant Biology* (Vol. 7, Number 3, pp. 285–295). https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.03.006

Schopfer, P. (2006). Biomechanics of plant growth. In *American Journal of Botany* (Vol. 93, Number 10, pp. 1415–1425). https://doi.org/10.3732/ajb.93.10.1415

Schuette, S., Wood, A. J., Geisler, M., Geisler-Lee, J., Ligrone, R., & Renzaglia, K. S. (2009). Novel localization of callose in the spores of Physcomitrella patens and phylogenomics of the callose synthase gene family. *Annals of Botany*, *103*(5), 749–756. https://doi.org/10.1093/aob/mcn268

Schwartz, A. R., Morbitzer, R., Lahaye, T., & Staskawicz, B. J. (2017). TALE-induced bHLH transcription factors that activate a pectate lyase contribute to water soaking in bacterial spot of tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(5), E897–E903. https://doi.org/10.1073/pnas.1620407114

Sénéchal, F., Habrylo, O., Hocq, L., Domon, J. M., Marcelo, P., Lefebvre, V., Pelloux, J., & Mercadante, D. (2017). Structural and dynamical characterization of the pH-dependence of the pectin methylesterase-pectin methylesterase inhibitor complex. *Journal of Biological Chemistry*, *292*(52), 21538–21547. https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.000197

Sénéchal, F., L'Enfant, M., Domon, J. M., Rosiau, E., Crépeau, M. J., Surcouf, O., Esquivel-Rodriguez, J., Marcelo, P., Mareck, A., Guérineau, F., Kim, H. R., Mravec, J., Bonnin, E., Jamet, E., Kihara, D., Lerouge, P., Ralet, M. C., Pelloux, J., & Rayon, C. (2015). Tuning of pectin

methylesterification: Pectin methylesterase inhibitor 7 modulates the processive activity of co-expressed pectin methylesterase 3 in a pH-dependentmanner. *Journal of Biological Chemistry*, *290*(38), 23320–23335. https://doi.org/10.1074/jbc.M115.639534

Sénéchal, F., Mareck, A., Marcelo, P., Lerouge, P., & Pelloux, J. (2015). Arabidopsis PME17 activity can be controlled by pectin methylesterase inhibitor4. *Plant Signaling and Behavior*, *10*(2). https://doi.org/10.4161/15592324.2014.983351

Sénéchal, F., Wattier, C., Rustérucci, C., & Pelloux, J. (2014). Homogalacturonan-modifying enzymes: Structure, expression, and roles in plants. *Journal of Experimental Botany*, *65*(18), 5125–5160. https://doi.org/10.1093/jxb/eru272

Seyedarabi, A., To, T. T., Ali, S., Hussain, S., Fries, M., Madsen, R., Clausen, M. H., Teixteira, S., Brocklehurst, K., & Pickersgill, R. W. (2010). Structural insights into substrate specificity and the anti β-elimination mechanism of pectate lyase. *Biochemistry*, *49*(3), 539–546. https://doi.org/10.1021/bi901503g

Shahin, L., Zhang, L., Mohnen, D., & Urbanowicz, B. R. (2023). Insights into pectin O-acetylation in the plant cell wall: structure, synthesis, and modification. In *The Cell Surface* (Vol. 9). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.tcsw.2023.100099

Shevchik, V. E., & Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. (2003). PaeX, a second pectin acetylesterase of Erwinia chrysanthemi 3937. *Journal of Bacteriology*, *185*(10), 3091–3100. https://doi.org/10.1128/JB.185.10.3091-3100.2003

Shibaya, T., & Sugawara, Y. (2009). Induction of multinucleation by β-glucosyl Yariv reagent in regenerated cells from Marchantia polymorpha protoplasts and involvement of arabinogalactan proteins in cell plate formation. *Planta*, *230*(3), 581–588. https://doi.org/10.1007/s00425-009-0954-y

Shimamura, M. (2015). Whole-mount immunofluorescence staining of plant cells and tissues. In *Plant Microtechniques and Protocols* (pp. 181–196). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-19944-3_11

Shin, Y., Chane, A., Jung, M., & Lee, Y. (2021). Recent advances in understanding the roles of pectin as an active participant in plant signaling networks. *Plants*, *10*(8). https://doi.org/10.3390/plants10081712

Silva, I. R., Jers, C., Meyer, A. S., & Mikkelsen, J. D. (2016). Rhamnogalacturonan I modifying enzymes: An update. In *New Biotechnology* (Vol. 33, Number 1, pp. 41–54). Elsevier. https://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.07.008

Sinclair, S. A., Larue, C., Bonk, L., Khan, A., Castillo-Michel, H., Stein, R. J., Grolimund, D., Begerow, D., Neumann, U., Haydon, M. J., & Krämer, U. (2017). Etiolated Seedling Development Requires Repression of Photomorphogenesis by a Small Cell-Wall-Derived Dark Signal. *Current Biology*, *27*(22), 3403-3418.e7. https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.063

Singh, A. P., Pandey, S. P., Rajluxmi, Pandey, S., Nath, P., & Sane, A. P. (2011). Transcriptional activation of a pectate lyase gene, RbPel1, during petal abscission in rose. *Postharvest Biology and Technology*, *60*(2), 143–148. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2010.12.014

Song, L., Gao, H., Chen, W., Chen, H., Mao, J., Zhou, Y., Duan, X., & Joyce, D. C. (2011). The role of 1-methylcyclopropene in lignification and expansin gene expression in peeled water bamboo shoot (Zizania caduciflora L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *91*(14), 2679–2683. https://doi.org/10.1002/jsfa.4512

Sousa, A. G., Nielsen, H. L., Armagan, I., Larsen, J., & Sørensen, S. O. (2015). The impact of rhamnogalacturonan-I side chain monosaccharides on the rheological properties of citrus pectin. *Food Hydrocolloids*, *47*, 130–139. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.01.013

Speicher, T. L., Li, P. Z., & Wallace, I. S. (2018). Phosphoregulation of the plant cellulose synthase complex and cellulose synthase-like proteins. In *Plants* (Vol. 7, Number 3). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/plants7030052

S. Rensing, S. Rombauts, Y. Van de Peer, & R. Reski. (2002). Moss transcriptome and beyond. *TRENDS in Plant Science*, *7*, 535–537. http://www.bioinf.man.ac.uk/

Srivastava, S., Gupta, S. M., Sane, A. P., & Nath, P. (2012). Isolation and characterization of ripening related pectin methylesterase inhibitor gene from banana fruit. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, *18*(2), 191–195. https://doi.org/10.1007/s12298-012-0102-1

Sterling, J. D., Atmodjo, M. A., Inwood, S. E., Kumar Kolli, V. S., Quigley, H. F., Hahn, M. G., & Mohnen, D. (2006). *Functional identification of an Arabidopsis pectin biosynthetic homogalacturonan galacturonosyltransferase*. https://www.pnas.org

Szövényi, P., Ricca, M., Hock, Z., Shaw, J. A., Shimizu, K. K., & Wagner, A. (2013). Selection is no more efficient in haploid than in diploid life stages of an angiosperm and a moss. *Molecular Biology and Evolution*, *30*(8), 1929–1939. https://doi.org/10.1093/molbev/mst095

Tang, H., Duijts, K., Bezanilla, M., Scheres, B., Vermeer, J. E. M., & Willemsen, V. (2020). Geometric cues forecast the switch from two- to three-dimensional growth in Physcomitrella patens. *New Phytologist*, *225*(5), 1945–1955. https://doi.org/10.1111/nph.16276

Tang, Q., Liu, Y. P., Ren, Z. G., Yan, X. X., & Zhang, L. Q. (2013). 1.37 Å Crystal structure of pathogenic factor pectate lyase from Acidovorax citrulli. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, *81*(8), 1485–1490. https://doi.org/10.1002/prot.24298

Tapre, *, & Jain, A. R. (2014). Pectinases: Enzymes for fruit processing industry. In *Article in International Food Research Journal* (Vol. 21, Number 2).

Tasgin, E., Babagil, A., & Nadaroglu, H. (2020). Immobilization of Purified Pectin Lyase from Acinetobacter calcoaceticus onto Magnetic Carboxymethyl Cellulose Nanoparticles and Its Usability in Food Industry. *Journal of Chemistry*, *2020*. https://doi.org/10.1155/2020/4791408

Thelander, M., Landberg, K., & Sundberg, E. (2018). Auxin-mediated developmental control in the moss Physcomitrella patens. In *Journal of Experimental Botany* (Vol. 69, Number 2, pp. 277–290). Oxford University Press. https://doi.org/10.1093/jxb/erx255

Tian, G. W., Chen, M. H., Zaltsman, A., & Citovsky, V. (2006). Pollen-specific pectin methylesterase involved in pollen tube growth. *Developmental Biology*, *294*(1), 83–91. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.02.026

Toth, I. K., van der Wolf, J. M., Saddler, G., Lojkowska, E., Hélias, V., Pirhonen, M., Tsror (Lahkim), L., & Elphinstone, J. G. (2011). Dickeya species: An emerging problem for potato production in Europe. In *Plant Pathology* (Vol. 60, Number 3, pp. 385–399). https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02427.x

Trogu, S., Ermert, A.L., Stahl, F. *et al.* Multiplex CRISPR-Cas9 mutagenesis of the phytochrome gene family in *Physcomitrium (Physcomitrella) patens*. *Plant Mol Biol* **107**, 327–336 (2021). https://doi.org/10.1007/s11103-020-01103-x

Turner, S., & Kumar, M. (2018). Cellulose synthase complex organization and cellulose microfibril structure. In *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and*

Engineering Sciences (Vol. 376, Number 2112). Royal Society Publishing. https://doi.org/10.1098/rsta.2017.0048

Van Den Brink, J., & De Vries, R. P. (2011). Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 91, Number 6, pp. 1477–1492). https://doi.org/10.1007/s00253-011-3473-2

van Dop, M., Fiedler, M., Mutte, S., de Keijzer, J., Olijslager, L., Albrecht, C., Liao, C. Y., Janson, M. E., Bienz, M., & Weijers, D. (2020). DIX Domain Polymerization Drives Assembly of Plant Cell Polarity Complexes. *Cell*, *180*(3), 427-439.e12. https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.01.011

Vega-Sánchez, M. E., Verhertbruggen, Y., Scheller, H. V., & Ronald, P. C. (2013). Abundance of mixed linkage glucan in mature tissues and secondary cell walls of grasses. *Plant Signaling and Behavior*, *8*(2). https://doi.org/10.4161/psb.23143

Vos, J. W., Dogterom, M., & Emons, A. M. C. (2004). Microtubules Become More Dynamic but Not Shorter during Preprophase Band Formation: A Possible "Search-and-Capture" Mechanism for Microtubule Translocation. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, *57*(4), 246–258. https://doi.org/10.1002/cm.10169

Voxeur, A., Gilbert, L., Rihouey, C., Driouich, A., Rothan, C., Baldet, P., & Lerouge, P. (2011). Silencing of the GDP-D-mannose 3,5-epimerase affects the structure and cross-linking of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II and plant growth in tomato. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(10), 8014–8020. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.198614

Voxeur, A., Habrylo, O., Guénin, S., Miart, F., Soulié, M. C., Rihouey, C., Pau-Roblot, C., Domon, J. M., Gutierrez, L., Pelloux, J., Mouille, G., Fagard, M., Höfte, H., & Vernhettes, S. (2019). Oligogalacturonide production upon Arabidopsis thaliana-Botrytis cinerea interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *116*(39), 19743–19752. https://doi.org/10.1073/pnas.1900317116

Wachananawat, B., Kuroha, T., Takenaka, Y., Kajiura, H., Naramoto, S., Yokoyama, R., Ishizaki, K., Nishitani, K., & Ishimizu, T. (2020). Diversity of Pectin Rhamnogalacturonan I Rhamnosyltransferases in Glycosyltransferase Family 106. *Frontiers in Plant Science*, *11*. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00997

Wang, D., Kanyuka, K., & Papp-Rupar, M. (2023). Pectin: a critical component in cell-wall-mediated immunity. In *Trends in Plant Science* (Vol. 28, Number 1, pp. 10–13). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2022.09.003

Wang, H., Guo, Y., Lv, F., Zhu, H., Wu, S., Jiang, Y., Li, F., Zhou, B., Guo, W., & Zhang, T. (2010). The essential role of GhPEL gene, encoding a pectate lyase, in cell wall loosening by depolymerization of the de-esterified pectin during fiber elongation in cotton. *Plant Molecular Biology*, *72*(4), 397–406. https://doi.org/10.1007/s11103-009-9578-7

Wang, T., McFarlane, H. E., & Persson, S. (2016). The impact of abiotic factors on cellulose synthesis. In *Journal of Experimental Botany* (Vol. 67, Number 2, pp. 543–552). Oxford University Press. https://doi.org/10.1093/jxb/erv488

Wang, Y., Li, X., Fan, B., Zhu, C., & Chen, Z. (2021). Regulation and function of defense-related callose deposition in plants. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Number 5, pp. 1–15). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/ijms22052393

Wang, Y., Wang, Z., Xu, Q., Du, G., Hua, Z., Liu, L., Li, J., & Chen, J. (2009). Lowering induction temperature for enhanced production of polygalacturonate lyase in recombinant Pichia pastoris. *Process Biochemistry*, *44*(9), 949–954. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.04.019

Waszczak, C., Yarmolinsky, D., Leal Gavarrón, M., Vahisalu, T., Sierla, M., Zamora, O., Carter, R., Puukko, T., Sipari, N., Lamminmäki, A., Durner, J., Ernst, D., Winkler, J. B., Paulin, L., Auvinen, P., Fleming, A. J., Andersson, M. X., Kollist, H., & Kangasjärvi, J. (2024). Synthesis and import of GDP-l-fucose into the Golgi affect plant–water relations. *New Phytologist*, *241*(2), 747–763. https://doi.org/10.1111/nph.19378

Whitewoods, C. D., Cammarata, J., Venza, Z. N., Sang, S., Crook, A. D., Aoyama, T., Wang, X. Y., Waller, M., Kamisugi, Y., Cuming, A. C., Szövényi, P., Nimchuk, Z. L., Roeder, A. H. K., Scanlon, M. J., & Harrison, C. J. (2020). Erratum: CLAVATA Was a Genetic Novelty for the Morphological Innovation of 3D Growth in Land Plants (Current Biology (2018) 28(15) (2365–2376.e5), (S0960982218307048), (10.1016/j.cub.2018.05.068)). In *Current Biology* (Vol. 30, Number 13, pp. 2645–2648). Cell Press. https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.06.015

Wickett, N. J., Mirarab, S., Nguyen, N., Warnow, T., Carpenter, E., Matasci, N., Ayyampalayam, S., Barker, M. S., Burleigh, J. G., Gitzendanner, M. A., Ruhfel, B. R., Wafula, E., Der, J. P., Graham, S. W., Mathews, S., Melkonian, M., Soltis, D. E., Soltis, P. S., Miles, N. W., … Leebens-Mack, J. (2014). Phylotranscriptomic analysis of the origin and early diversification of land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(45), E4859–E4868. https://doi.org/10.1073/pnas.1323926111

Widiez, T., Symeonidi, A., Luo, C., Lam, E., Lawton, M., & Rensing, S. A. (2014). The chromatin landscape of the moss Physcomitrella patens and its dynamics during development and drought stress. *Plant Journal*, *79*(1), 67–81. https://doi.org/10.1111/tpj.12542

Willats, W. G. T., McCartney, L., Steele-King, C. G., Marcus, S. E., Mort, A., Huisman, M., Van Alebeek, G. J., Schols, H. A., Voragen, A. G. J., Le Goff, A., Bonnin, E., Thibault, J. F., & Knox, J. P. (2004). A xylogalacturonan epitope is specifically associated with plant cell detachment. *Planta*, *218*(4), 673–681. https://doi.org/10.1007/s00425-003-1147-8

Wolf, S., Mravec, J., Greiner, S., Mouille, G., & Höfte, H. (2012). Plant cell wall homeostasis is mediated by brassinosteroid feedback signaling. *Current Biology*, *22*(18), 1732–1737. https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.07.036

Wormit, A., & Usadel, B. (2018). The multifaceted role of pectin methylesterase inhibitors (PMEIs). In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Number 10). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/ijms19102878

Wu, P., Yang, S., Zhan, Z., & Zhang, G. (2020). MINI-REVIEW Origins and features of pectate lyases and their applications in industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 7247–7260. https://doi.org/10.1007/s00253-020-10769-8/Published

Xiao, C., Barnes, W. J., Zamil, M. S., Yi, H., Puri, V. M., & Anderson, C. T. (2017). Activation tagging of Arabidopsis POLYGALACTURONASE INVOLVED IN EXPANSION2 promotes hypocotyl elongation, leaf expansion, stem lignification, mechanical stiffening, and lodging. *Plant Journal*, *89*(6), 1159–1173. https://doi.org/10.1111/tpj.13453

Xiao, C., Somerville, C., & Anderson, C. T. (2014). POLYGALACTURONASE INVOLVED IN EXPANSION1 functions in cell elongation and flower development in Arabidopsis. *Plant Cell*, *26*(3), 1018–1035. https://doi.org/10.1105/tpc.114.123968

Xu, B., Stålbrand, H., & Janson, J.-C. (2002). endo-b-1,4-Mannanases from blue mussel, Mytilus edulis: purification, characterization, and mode of action. In *Journal of Biotechnology* (Vol. 92). www.elsevier.com/locate/jbiotec

Yadav, S., Yadav, P. K., Yadav, D., & Yadav, K. D. S. (2009). Pectin lyase: A review. In *Process Biochemistry* (Vol. 44, Number 1, pp. 1–10). https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.09.012

Yamaguchi, Y. L., Ishida, T., & Sawa, S. (2016). CLE peptides and their signaling pathways in plant development. In *Journal of Experimental Botany* (Vol. 67, Number 16, pp. 4813–4826). Oxford University Press. https://doi.org/10.1093/jxb/erw208

Yang, Yang, Yu, Y., Liang, Y., Anderson, C. T., & Cao, J. (2018). A profusion of molecular scissors for pectins: classification, expression, and functions of plant polygalacturonases. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 9). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01208

Yang, Yuankun, Zhang, Y., Li, B., Yang, X., Dong, Y., & Qiu, D. (2018). A verticillium dahliae pectate lyase induces plant immune responses and contributes to virulence. *Frontiers in Plant Science*, *9*. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01271

Yapo, B. M., Lerouge, P., Thibault, J. F., & Ralet, M. C. (2007). Pectins from citrus peel cell walls contain homogalacturonans homogenous with respect to molar mass, rhamnogalacturonan I and rhamnogalacturonan II. *Carbohydrate Polymers*, *69*(3), 426–435. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.12.024

Ye, Z. H., & Zhong, R. (2022). Cell wall biology of the moss Physcomitrium patens. In *Journal of Experimental Botany* (Vol. 73, Number 13, pp. 4440–4453). Oxford University Press. https://doi.org/10.1093/jxb/erac122

Yi, P., & Goshima, G. (2020). Rho of Plants GTPases and Cytoskeletal Elements Control Nuclear Positioning and Asymmetric Cell Division during Physcomitrella patens Branching. *Current Biology*, *30*(14), 2860-2868.e3. https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.05.022

Zagorchev, L., Kamenova, P., & Odjakova, M. (2014). The role of plant cell wall proteins in response to salt stress. In *The Scientific World Journal* (Vol. 2014). https://doi.org/10.1155/2014/764089

Zandleven, J., Beldman, G., Bosveld, M., Benen, J., & Voragen, A. (2005). Mode of action of xylogalacturonan hydrolase towards xylogalacturonan and xylogalacturonan oligosaccharides. In *Biochem. J*. http://portlandpress.com/biochemj/article-pdf/387/3/719/721755/bj3870719.pdf

Zandleven, J., Beldman, G., Bosveld, M., Schols, H. A., & Voragen, A. G. J. (2006). Enzymatic degradation studies of xylogalacturonans from apple and potato, using xylogalacturonan hydrolase. *Carbohydrate Polymers*, *65*(4), 495–503. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.02.015

Zandleven, J., Sørensen, S. O., Harholt, J., Beldman, G., Schols, H. A., Scheller, H. V., & Voragen, A. J. (2007). Xylogalacturonan exists in cell walls from various tissues of Arabidopsis thaliana. *Phytochemistry*, *68*(8), 1219–1226. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.01.016

Zhang, W., Wang, H., Chen, Yuhua, Liu, M., Guo, X., Zhang, R., Luo, K., & Chen, Yinhua. (2025). The XTH Gene Family in Cassava: Genomic Characterization, Evolutionary Dynamics, and Functional Roles in Abiotic Stress and Hormonal Response. *Agronomy*, *15*(9). https://doi.org/10.3390/agronomy15092194

Zhao, C., Jiang, W., Zayed, O., Liu, X., Tang, K., Nie, W., Li, Yali, Xie, S., Li, Yuan, Long, T., Liu, L., Zhu, Y., Zhao, Y., & Zhu, J. K. (2021). The LRXs-RALFs-FER module controls plant growth and salt stress responses by modulating multiple plant hormones. *National Science Review*, *8*(1). https://doi.org/10.1093/nsr/nwaa149

Zhao, X., Ebert, B., Zhang, B., Liu, H., Zhang, Y., Zeng, W., Rautengarten, C., Li, H., Chen, X., Bacic, A., Wang, G., Men, S., Zhou, Y., Heazlewood, J. L., & Wu, A. M. (2020). UDP-Api/UDP-Xyl synthases affect plant development by controlling the content of UDP-Api to regulate the RG-II-borate complex. *Plant Journal*, *104*(1), 252–267. https://doi.org/10.1111/tpj.14921

Zheng, J., Chen, J., Zhang, H., Wu, D., Ye, X., Linardt, R. J., & Chen, S. (2020). Gelling mechanism of RG-I enriched citrus pectin: Role of arabinose side-chains in cation- and acid-induced gelation. *Food Hydrocolloids*, *101*. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105536

Zheng, L., Xu, Y., Li, Q., & Zhu, B. (2021). Pectinolytic lyases: a comprehensive review of sources, category, property, structure, and catalytic mechanism of pectate lyases and pectin lyases. In *Bioresources and Bioprocessing* (Vol. 8, Number 1). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. https://doi.org/10.1186/s40643-021-00432-z

Zheng, Y., Huang, C. H., Liu, W., Ko, T. P., Xue, Y., Zhou, C., Guo, R. T., & Ma, Y. (2012). Crystal structure and substrate-binding mode of a novel pectate lyase from alkaliphilic Bacillus sp. N16-5. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *420*(2), 269–274. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.02.148

Zhong, R., Cui, D., & Ye, Z. H. (2019). Evolutionary origin of O-acetyltransferases responsible for glucomannan acetylation in land plants. *New Phytologist*, *224*(1), 466–479. https://doi.org/10.1111/nph.15988

Zhong, R., Zhou, D., Chen, L., Rose, J. P., Wang, B. C., & Ye, Z. H. (2024). Plant Cell Wall Polysaccharide O-Acetyltransferases. In *Plants* (Vol. 13, Number 16). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). https://doi.org/10.3390/plants13162304

Zhou, Z., Shi, H., Chen, B., Zhang, R., Huang, S., & Fu, Y. (2015). Arabidopsis RIC1 severs actin filaments at the apex to regulate pollen tube growth. *Plant Cell*, *27*(4), 1140–1161. https://doi.org/10.1105/tpc.114.135400

Zhu, L., Dama, M., & Pauly, M. (2017). *Identification of an arabinopyranosyltransferase from* Physcomitrella patens *involved in the synthesis of the hemicellulose xyloglucan*. https://doi.org/10.1101/241521

Zykwinska, A., Thibault, J. F., & Ralet, M. C. (2008). Competitive binding of pectin and xyloglucan with primary cell wall cellulose. *Carbohydrate Polymers*, *74*(4), 957–961. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.05.004

Résumé :

Caractérisation biochimique et fonctionnelle de polygalacturonases (PG) chez *Physcomitrium patens*.

La croissance et la morphogenèse végétales reposent sur un remodelage fin de la paroi cellulaire primaire, structure dynamique dont les propriétés mécaniques sont principalement modulées par les pectines. La structure des homogalacturonanes (HG), principal composant des pectines, est notamment finement contrôlée par les polygalacturonases (PG) et les pectine méthylestérases (PME). Dans cette thèse, *Physcomitrium patens* a été utilisé comme modèle pour analyser le rôle des PGs dans le développement, notamment au cours de la croissance bidimensionnelle des protonémas, composés de chloronémas et de caulonémas. L'utilisation du Polyphenon 60 (PP60), un inhibiteur polyphénolique des enzymes de remodelage pectique, a montré une augmentation globale de l'aire des protonémas, associée à une réduction de l'élongation cellulaire mais à une augmentation du branchement des caulonémas. Au contraire, le branchement des chloronémas est réduit, indiquant des réponses cellulaires différentes à l'altération du remodelage pectique. En parallèle, la production et l'analyse de mutants de délétion (*pppg2*, *pppg3*, et double mutant *pppg2/pppg3*), de surexpression (PPPG4 iOX) et de mutants multiples générés par méthode CRISPR-Cas9, révèlent que toute perturbation de l'activité des PGs (augmentation ou diminution), entraîne une réduction du développement des protonémas. Ces observations soulignent la nécessité d'un équilibre précis de la plasticité pariétale pour permettre l'expansion, la division et les branchements cellulaires. Ces effets contrastent avec l'absence d'impact notable sur le développement des gamétophores, suggérant que ces tissus différenciés dépendent moins du remodelage des HG et reposent davantage sur des réseaux de cellulose et d'hémicelluloses. Enfin, la caractérisation biochimique et structurale de plusieurs PGs de *P. patens* (PpPG2, PpPG3, PpPG4) confirme leur activité sur les HG, révèle des différences de spécificité enzymatique et identifie PpPG3 en tant que orthologue de AtQRT3, suggérant une diversité fonctionnelle au sein de cette famille. Les études effectuées durant cette thèse démontrent que les polygalacturonases sont des régulateurs clés de la morphogenèse des protonémas de *Physcomitrium patens* et ouvre des perspectives intégrant génétique, biochimie et mécanique pariétale pour mieux comprendre le rôle du remodelage pectique dans le développement végétal.
Mots clés : *Parois végétales ; Pectines ; Polygalacturonases.*

Abstract :

Biochemical and functional characterization of polygalacturonases (PG) in *Physcomitrium patens*.

Plant growth and morphogenesis depend on controlled remodeling of the primary cell wall, a dynamic structure whose mechanical properties are mainly regulated by pectins, and in particular homogalacturonans (HGs). The fine structure of HGs is notably finely controlled by polygalacturonases (PGs) and pectin methylesterases (PMEs). In this thesis, *Physcomitrium patens* was used as a model to study the role of PGs in development, with a particular focus on the two-dimensional growth of protonemata, which consist of chloronemal and caulonemal cells. Treatment with Polyphenon 60 (PP60), a polyphenolic inhibitor of pectin-remodeling enzymes, led to an overall increase in protonemal area, combined with reduced cell elongation and increased branching of caulonemata, while chloronemal branching was reduced. This indicates that the two cell types respond differently to changes in pectin remodeling. In parallel, the analysis of deletion mutants (*pppg2*, *pppg3*, and the *pppg2/pppg3* double mutant), of an inducible overexpression line (PPPG4 iOX), and of multiple mutants generated using CRISPR–Cas9 method, showed that changes (increase or decrease) in PG activity impairs protonemal development. These results highlight the need for a precise balance of cell wall plasticity to allow proper cell expansion, division, and branching. In contrast, no major effects were observed on gametophore development, suggesting that these differentiated tissues are less dependent on HG remodeling and would depend more on cellulose and hemicellulose network. Finally, biochemical and structural analyses of several *P. patens* PGs (PpPG2, PppG3, PpPG4) confirmed their activity on HGs, revealing differences in substrate specificity, and identified PpPG3 as an ortholog of AtQRT3, indicating functional diversity within this enzyme family. Overall, this work demonstrates that polygalacturonases play a key role in regulating protonemal morphogenesis in *Physcomitrium patens* and provides a framework combining genetics, biochemistry, and cell wall mechanics to better understand pectin remodeling during plant development.
Key words : *Cell Wall ; Pectins ; Polygalacturonases.*