



-UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE 1-

THÈSE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE 1

Discipline: Stratégies d'Exploitation des Fonctions Biologiques

Présenté par:

David WINDELS

ÉTUDE DE L' IMPLICATION DES ARABINOGALACTANE
PROTEINES (AGPs) AU COURS DE L'EMBRYOGENÈSE
SOMATIQUE CHEZ DIFFÉRENTS GENOTYPES DE CHICORÉE

Soutenu le 28 septembre 2005

Rapporteur:	Pr Patrice Lerouge	université de ROUEN
Rapporteur:	Dr Jean-Luc Verdeil	CIRAD MONTPELLIER
Examineur:	Dr Paul Knox	university of LEEDS
Examineur:	Dr Anne-Sophie Blervacq	université de LILLE1
Examineur:	Pr Jean-Louis Hilbert	université de LILLE1
Examineur:	Pr Jean-Claude Michalski	université de LILLE1

-Laboratoire de Physiologie de la Différenciation Végétale-

Remerciements

Mon travail de thèse a été réalisé au sein du laboratoire de Physiologie de la Différenciation Végétale UPRESS EA 3569-IFR 118 et en collaboration avec le laboratoire de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle UMR 8576 de l'université de LILLE 1. Je remercie les professeurs Jean-Louis Hilbert et Jean-Claude Michalski pour leur accueil et leur encadrement.

Je tiens à remercier le professeur Patrice Lerouge et le docteur Jean-luc Verdeil d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail, ainsi qu'à Jean-Paul Knox pour sa participation au jury de thèse.

Je voudrais adresser mes plus sincères remerciements à Anne-sophie Blervacq, pour son encadrement et son aide précieuse durant ma thèse et sa très grande patience à mon égard.

Je remercie également Calliope Capon pour m'avoir initié aux techniques de biochimies et pour son aide apportée lors de mes tentatives de caractérisation des AGPs.

Merci à Collette Brassard pour les différentes analyses d'acides aminés.

Un grand merci à l'ensemble des personnes du laboratoire pour m'avoir supporté et spécialement aux étudiants du bureau 310 : Francky, Sylvain dit Cht'iot père, Philippe dit Grand-père, Clara, Sophie, Estelle, Eugénie et Aline, enfin vous n'aurez plus à supporter ma musique et mes blagues.



SOMMAIRE

Liste des illustrations	p 1
Abréviations	p 3
Introduction	p 5
Analyses bibliographiques	p 7
I. L'embryogenèse somatique	p 7
1. Définitions	P 7
2. Les phases précoces	p 9
2.1. Induction et réactivation cellulaire	p 9
2.2. La première division des cellules embryogènes	p 11
3. Les phases tardives: stades quatrant à cotylédonnaire	p 11
4. La maturation des embryons et la dormance	p 14
II. La paroi cellulaire	p 16
1. Implication de la paroi dans l'embryogenèse somatique	p 16
2. Les différents constituants de la paroi cellulaire	P 19
2.1. Les polysaccharides	p 20
2.2. Les composées phénoliques	P 22
2.3. Les enzymes et protéines pariétales	p 23
2.3.1. Les enzymes pariétales	p 23
2.3.2. Les protéines pariétales	P 23
2.3.2.1. Les GRPs	p 24
2.3.2.2. Les extensines	p 24
2.3.2.3. Les lectines et PRPs	p 25
2.3.2.4. Les arabinogalactanes protéines : AGPs	p 26
III. Les AGPs	p 27
1. La structure des AGPs	P 28
1.1. L'ossature protéique	P 28
1.2. La partie glycanique	p 30
2. Les modifications post-traductionnelles	p 31
2.1. Hydroxylation des prolines	p 32
2.2. Glycosylations	p 32
2.3. Addition d'une ancre GPI	p 34
3. Lieux d'expression des AGPs	p 39
4. Rôles des AGPs	p 41
5. Modes d'action des AGPs	p 42
6. Les intérêts et applications des AGPs	p 44

IV. La Chicorée plante modèle de l'ES	p 45
1. La chicorée	p 45
2. Contextes scientifiques et objectifs	p 48
2.1 Contextes scientifiques	p 48
2.2 Objectifs	p 49
Matériel et méthodes.	p 52
I. Matériel	p 52
II. Méthodes	p 52
1. Mise en culture pour l'obtention d'embryons somatiques	P 52
2. Propagation clonale du matériel végétal	p 54
3. Précipitation et dosage des AGPs	p 56
3.1. Préparation du β -D-glucosyl Yariv	p 56
3.2. Extraction et purification des AGPs	p 57
3.3. Dosage des AGPs	p 57
4. Analyses des AGPs	p 59
4.1. Gel électrophorétique	p 59
4.2. Séparation par HPLC	p 60
4.3. Analyses des fractions	p 61
4.3.1. Composition en monosaccharides	p 61
4.3.2. Composition en acides aminés	p 61
4.3.3. Western Blot	p 61
5. Analyses cytologiques	p 63
5.1. Comptage des embryons somatiques	p 63
5.2. Inclusion	p 63
5.2.1. Inclusion en résine JB4 : cytologie classique	p 64
5.2.2. Inclusion en BMMC : immunocytologie	p 64
5.3. Réalisation et contrôle des coupes	P 66
5.4. L'immunolocalisation	P 67
6. Prétraitement des plantes	P 68
7. Modifications des conditions et des milieux de culture	P 68
7.1. Culture en présence de β -D-Glc Yariv	p 68
7.2. Culture en présence de monosaccharides et de proline	p 68
7.3. Culture en présence d'inhibiteur de la phospholipase C	p 69
7.3.1. Culture en présence de néomycine	p 69
7.3.2. Culture en présence de l'U73122	p 69
8. Extraction de membrane plasmique et action de la phospholipase C	p 70
9. Mise en évidence de l'ancre GPI	p 70
Résultats et Discussions	p 73

1^{ère} Partie:	p 73
Introduction	p 73
I. Etude des AGPs chez l'hybride interspécifique « 474 » (<i>C. intybus</i> x <i>C. endivia</i>) Etude donnant lieu à l'écriture d'un article soumis à Plant Physiology and Biochemistry.	
Effects of explant pretreatments on somatic embryogenesis in embryogenic and recalcitrant <i>Cichorium</i> cultivars. II. Involvement of AGPs. Windels D, Demilly M, Blervacq A-S, Couillerot J-P, Capon C, Michalski J-C, Hilbert J-L.	P 75
II. Etude des AGPs chez les individus Kospol (<i>C. intybus</i>)	p 93
Conclusion	p 100
2^{ème} Partie:	p 102
Introduction	p 102
Détermination du type AGPs libérées au cours de l'embryogenèse somatique Etude donnant lieu à l'écriture d'un article soumis à Planta	
GPI-anchored AGPs are released during somatic embryogenesis in <i>Cichorium</i>. D Windels, I Habarugira, A-S Blervacq, J-P Zanetta, Y Leroy, B Delbreil, M-C Quillet, E Goulas, J-P Couillerot, J-C Michalski, J-L Hilbert.	P 103
Conclusion	p 124
Conclusions générales et perspectives	P 126
Références bibliographiques	p 129
Annexes	p 147
Listes des publications et communications scientifiques	p.152

Liste des illustrations

Figures :

Figure 1 : Stade de développement de l'embryogenèse zygotique chez <i>Arabidopsis thaliana</i> .	p 12
Figure 2: Schéma de la structure d'une jeune paroi végétale.	p 19
Figure 3: Modélisation de l'assemblage des fibres de cellulose.	p 21
Figure 4: Structure chimique du réactif de YARIV.	p 27
Figure 5: Classification des AGPs selon leur structure protéique.	p 29
Figure 6: Structure des chaînes d'arabinogalactanes de type II.	p 31
Figure 7: Modélisation de la partie glycanique des AGPs.	p 34
Figure 8: Séquence consensus pour l'addition d'une ancre GPI.	p 35
Figure 9: Structure de l'ancre GPI.	p 36
Figure 10: Voie de synthèse et addition de l'ancre glycosylphosphatidylinositol.	p 37
Figure 11: Modèles des différentes modalités d'action des AGPs.	p 43
Figure 12: Cycle biologique et agronomique de la chicorée.	p 47
Figure 13: Schématisation de la mise en culture des feuilles et racines pour l'obtention d'embryons somatiques.	p 53
Figure 14: Représentation schématique de la régénération et de l'obtention du matériel biologique en vue d'analyses cytologiques et biochimiques	p 55
Figure 15: Schématisation de la méthode de purification des AGPs.	p 57
Figure 16: Dosage des AGPs par la méthode de gel à diffusion radiale.	p 58
Figure 17: Profil électrophorétique des AGPs issus du milieu de culture de feuille de K59.	p 94
Figure 18: Profils HPLC des AGPs libérées dans le milieu de culture	p 94

Figure 19: Composition en monosaccharides et en acides aminés des différentes fractions d'AGPs du génotype K59 p 96

Figure 20: Comparaison du potentiel embryogène du génotype K59 par addition de Proline, d'un mélange de monosaccharides ou la combinaison proline monosaccharides pendant huit jours de culture de feuille (A) ou de racine (B). p 97

Figure 21: Comparaison du potentiel embryogène des racines du génotype K59 par addition de proline et d'un monosaccharide. p 99

Tableaux :

Tableau 1: Anticorps anti-AGP et leurs épitopes. p 40

Tableau 2: Programme d'élution des AGPs par HPLC. P 60

Tableau 3: Comparaison des fractions AGPs entre 474 et K59 issus de la séparation par HPLC des AGPs. p 95

Abréviations

AGs:	Arabinogalactanes
AGPs:	Arabinogalactane protéines
AIA:	Acide indole acétique ou « 2,4 D »
Ala:	Alanine
ANA:	Acide Naphtalène acétique
Asn:	Asparagine
β-D-glycosyl-Y:	β-glucosyl phenylazo (1, 3,5-tris [4-β-D-glucopyranosyl-oxyphenylazo] 2, 4,6-trihydroxybenzene
BAP:	Benzyl aminopurine
BMMC:	Méthyl-Butyle Méthacrylate
Cys:	Cystéine
DAH:	1,7-diaminoheptane
FLAs:	Fasciclins
GA:	Gomme arabique
Gal:	Galactose
Glc:	Glucose
Glu:	Glutamine
Gly:	Glycine
GPI:	Glycosyl-PhosphatidylInositol
GRPs:	Glycoprotéines riche en glycine
GTs:	Glycosyl-transférases
HFBA:	Heptafluorobutyrate anhydre
HGs:	Homogalacturonanes
His:	Histidine
HPLC:	High performance liquid chromatography
HRGPs:	Glycoprotéines riches en hydroxyproline
Hyp:	Hydroxyproline

Lys:	Lysine
Man:	Mannose
MS:	Murashige et Skoog
GlcNAc:	N-acétyl-glucosamine
GalNAc:	N-acétyl-galactosamine
GalNH₂:	Galactosamine
GlcNH₂:	Glucosamine
PLC:	Phospholipase C
PLD:	Phospholipase D
Pro:	Proline
PRPs:	Glycoprotéines riches en proline
RG-I:	Rhamnogalacturonanes-I
RG-II:	Rhamnogalacturonanes-II
SDS:	Sodium dodecyl sulfate
Ser:	Sérine
Thr:	Thréonine
Tyr:	Tyrosine
U73122:	1-[6-(((17 β)-3-Methoxyestra-1,3,5[10]-trien-17-yl)amino)hexyl]-1H-pyrrole-2,5-dione
U73343:	1-[6-(((17 β)-3-Methoxyestra-1,3,5[10]-trien-17-yl)amino)hexyl]- 2,5-pyrroldione
Val:	Valine
XET:	Xyloglucan endotransglycosylase
2iP:	Diméthylallilaminopurine



INTRODUCTION

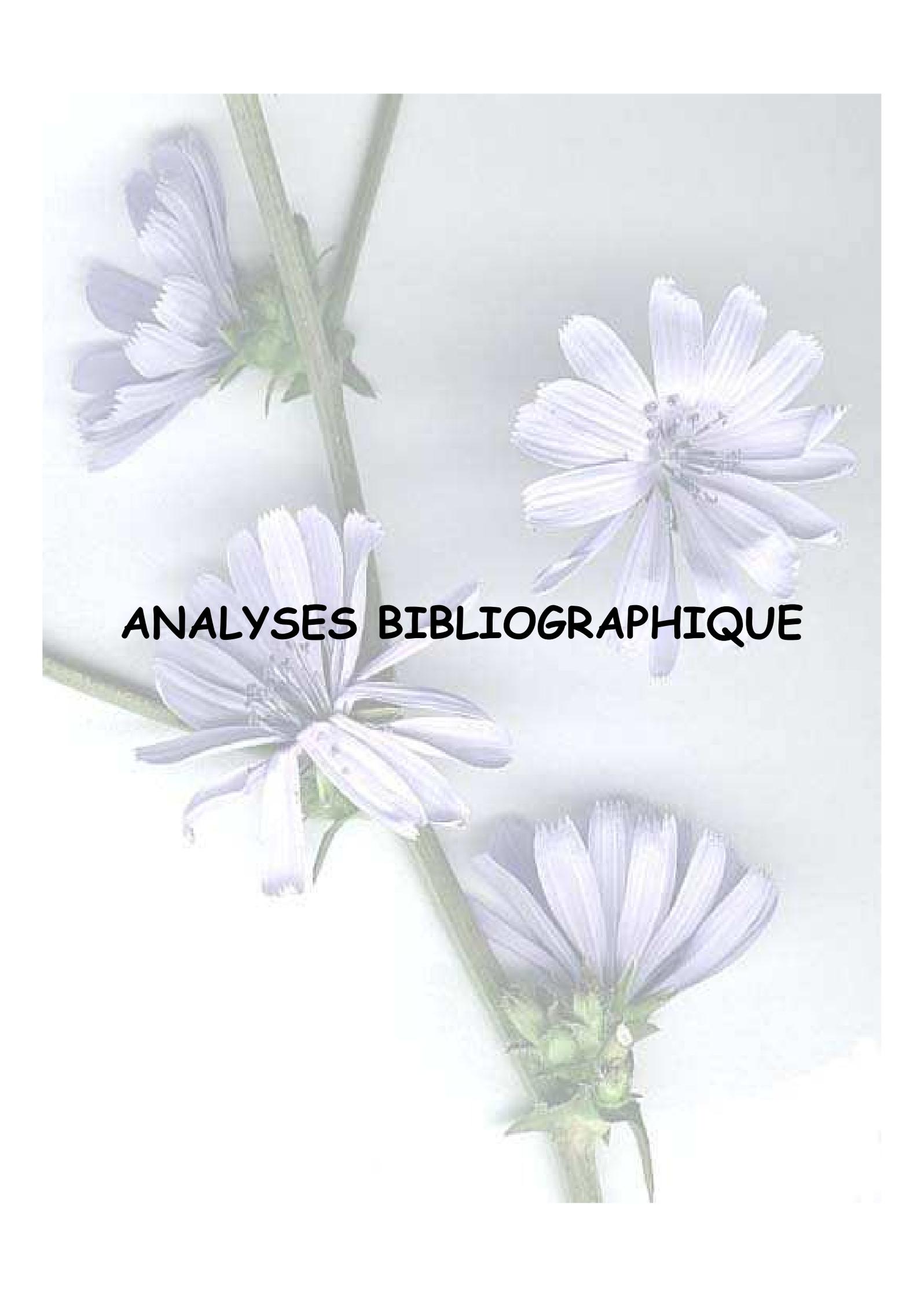
Introduction

De part leur immobilité, les plantes ont été amenées à développer de très nombreuses stratégies pour s'adapter aux conditions du milieu extérieur et se reproduire. L'une de ces adaptations est la capacité des cellules végétales à se dédifférencier. Ces cellules dites totipotentes pourront subir une reprogrammation et ainsi se redifférencier et s'engager vers des programmes d'organogenèse ou d'embryogenèse non sexuée dit embryogenèse somatique selon les signaux extérieurs reçus.

L'embryogenèse somatique présente plusieurs avantages par rapport à l'embryogenèse zygotique, dont celui d'être un modèle analogue à l'embryogenèse zygotique dont l'étude est plus aisée, mais aussi pour la propagation clonale rapide. Ce mécanisme est décrit dans tout le règne végétal, à partir d'un grand nombre de tissus différents (Zorinians *et al.*, 2003). Cependant pour certaines espèces ou tissus, l'embryogenèse somatique est peu abondante ou difficile à obtenir. Or ces plantes plus ou moins « récalcitrantes » sont souvent des plantes d'intérêts agronomiques ou économiques. La compréhension et l'étude des mécanismes d'induction et d'expression de l'embryogenèse somatique permettraient d'améliorer et de développer les techniques d'obtention d'embryons somatiques chez des plantes d'intérêt.

Dans cette optique, un des thèmes de recherche de notre laboratoire consiste en l'étude des phases physiologiques précoces impliquées dans l'embryogenèse somatique chez la chicorée, plante modèle. Plusieurs approches ont été entreprises, telles que les analyses cytologiques, physiologiques mais aussi des approches moléculaires. Dans le cadre de travaux précédents, des modifications pariétales avaient été observées au cours de l'embryogenèse somatique de la chicorée (Chapman *et al.*, 2000a ; 2000b). Il a également été

établi que les ArabinoGalactanes Protéines (AGPs) avaient un rôle prépondérant dans ces phases précoces (Chapman *et al.*, 2000c). Ce travail de thèse a eu pour objectif de contribuer à approfondir la compréhension du rôle ainsi que du mode d'action de ces AGPs au cours des phases précoces de l'embryogenèse somatique.

The image features four purple flowers on green stems, arranged in a cross-like pattern. The flowers have many thin, pointed petals. The background is a soft, light blue-grey gradient. The text 'ANALYSES BIBLIOGRAPHIQUE' is centered over the image in a bold, black, sans-serif font.

ANALYSES BIBLIOGRAPHIQUE

I. L'embryogenèse somatique

L'étude de l'embryogenèse zygotique est un moyen d'approche permettant d'appréhender les mécanismes de développement des être vivants. Cependant cette étude est rendue difficile car les stades de l'embryogenèse se situent au sein des tissus maternels, permettant difficilement l'accès aux structures embryonnaires. Une alternative dans l'étude des mécanismes de l'embryogenèse est cependant possible grâce à l'obtention d'embryons somatiques, qui ont un développement similaire au développement des embryons zygotiques.

1. Définitions

L'embryogenèse somatique est le phénomène par lequel des cellules diploïdes initient un programme de développement aboutissant à la formation d'un embryon bipolaire sans qu'il y ait eu fusion de gamètes. L'obtention de cellules embryogènes¹ à partir de cellules somatiques nécessite une étape de dédifférenciation préalable induite par des stimuli externes. Cette dédifférenciation aboutira à une réactivation cellulaire correspondant à une réinitiation des divisions cellulaires. Seules certaines cellules semblent réceptives à ces stimuli et seront alors qualifiées de cellules compétentes à l'embryogenèse (De Jong *et al.*, 1993). Les cellules compétentes exprimeront leur caractère embryogène après leur induction, en jouant sur l'environnement des cultures cellulaires comme la balance hormonale, les conditions osmotiques, le saccharose, les acides aminés et la concentration en sels (Armstrong *et al.*, 1985 ; Rhodes *et al.*, 1986).

L'embryogenèse somatique peut être d'origine unicellulaire ou pluricellulaire. L'embryon somatique peut avoir pour origine une seule et unique cellule (origine unicellulaire) qui se divise et forme un embryon somatique sous l'effet d'une

¹ Cellules qui initient un programme d'embryogenèse somatique

induction ou alors peut avoir pour origine plusieurs cellules (masses pré-embryogènes: origine pluricellulaire) issues d'un cal ou d'un tissu (Williams *et al.*, 1986).

On distingue deux types d'embryogenèse somatique: directe et indirecte. L'embryogenèse somatique est dite directe quand les embryons sont formés sans aucune phase préalable de prolifération cellulaire (callogenèse). Les embryons somatiques peuvent être initiés à partir d'une cellule unique comme chez le trèfle (Maheswaran *et al.*, 1985), chez la chicorée (Dubois *et al.*, 1988 ; 1991), mais également d'un massif de cellules comme chez le tournesol (Laparra *et al.*, 1997).

L'embryogenèse somatique est qualifiée d'indirecte lorsqu'une prolifération cellulaire apparaît au cours de la première phase de culture d'un explant. Les embryons somatiques sont issus de cet ensemble de cellules indifférenciées appelé cal. La majorité des systèmes embryogènes indirects présentent une embryogenèse somatique d'origine pluricellulaire comme chez le blé (Vasil *et al.*, 1990) et l'hévéa (Michaux-Ferrière *et al.*, 1992). Cependant, chez la carotte, elle est d'origine unicellulaire (Toonen *et al.*, 1994).

Le développement d'embryons somatiques peut s'effectuer directement à la surface d'embryons zygotiques ou somatiques (Jones *et al.*, 1989 ; Kristensen *et al.*, 1994) comme chez *Quercus suber* (Puigderrajols *et al.*, 2001). Ce type d'embryogenèse est qualifié d'embryogenèse adventive ou secondaire.

L'embryogenèse somatique présente plusieurs avantages. D'une part elle permet une multiplication clonale rapide et nombreuse, et elle se produit en milieu contrôlé. De plus, la possibilité de générer des embryons somatiques, à partir de différents explants, procure l'avantage d'étudier plus facilement les mécanismes moléculaires et physiologiques de l'embryogenèse du fait d'une accessibilité aisée aux phases précoces et tardives de l'embryogenèse somatique.

Contrairement à l'aspect physiologique, l'aspect morphologique et cytologique des embryogenèses somatique et zygotique est très largement décrit dans la littérature. Les différences physiologique et morphologique entre l'embryogenèse zygotique et somatique se situent essentiellement au début et à la fin du développement de l'embryon et par l'absence du développement du suspenseur dans le cas de l'embryogenèse somatique. Les étapes intermédiaires comprises entre le stade globulaire et cotylédonaire sont très similaires.

2. Les phases précoces

2.1. Induction et réactivation cellulaire

L'induction de l'embryogenèse somatique chez les plantes peut être « naturelle » (Duijs *et al.*, 1992 ; Zarsky *et al.*, 1992 ; Kristensen *et al.*, 1994) ou dépendante de l'application de traitements constitués de facteurs biotiques ou abiotiques.

L'induction nécessaire à l'activation de cellules compétentes (Verdeil *et al.*, 2001) peut être obtenue par l'action d'auxine comme chez *Daucus carota* (Toonen *et al.*, 1994), *Medicago sativa* (Dos Santos *et al.*, 1983 ; Blöchl *et al.*, 2005) par le 2,4-D (2,4-D : acide 2,4-dichlorophenoxy acétique) ou par ANA (acide naphthalène acétique) chez la chicorée². Cependant dans le cas de la carotte, contrairement à celui de la chicorée, il est nécessaire pour l'expression de l'embryogenèse somatique de transférer les cellules sur un milieu sans hormones. Chez la carotte, selon la concentration et le temps de contact de l'auxine avec l'explant, le processus d'embryogenèse somatique peut être direct (temps d'exposition court) ou indirect (temps d'exposition long). Dans le cas de la chicorée, l'embryogenèse somatique est d'origine unicellulaire et directe (Blervacq *et al.*, 1995). L'auxine n'est pas le seul facteur permettant la réinitiation des divisions cellulaires.

² La chicorée a besoin aussi d'une autre hormone, le 2iP (cytokinine), elle aussi fournie à de faibles doses.

D'autres phytohormones comme l'acide abscissique, ou les cytokinines, peuvent induire le passage de cellules épidermiques d'embryon immature à celui de cellules embryogènes (Maheswaran *et al.*, 1985). Pour exemple une application successive de 2,4-D puis de zéatine chez *Daucus carota* (Nomura *et al.*, 1985) et de benzyladénine chez *Fagus sylvatica* (Vieitez *et al.*, 1992) permet également l'induction de l'embryogenèse somatique, pour *Picea albies* c'est l'addition d'ABA qui est nécessaire (Pullman *et al.*, 2005).

Hormis les phytohormones, de nombreux autres facteurs peuvent être déterminants comme un choc de température (Décout *et al.*, 1994), le calcium (Timmers *et al.*, 1996), un gradient électrique (Dijak *et al.*, 1986) ou dans le modèle carotte le changement de pH qui est suffisant pour induire la réactivation cellulaire (Smith *et al.*, 1990). On peut aussi changer la pression osmotique par augmentation de la concentration en saccharose, en chlorure de sodium ou encore par des sels de métaux lourds (Bronner *et al.*, 1994 ; Chatthai *et al.*, 1997). Dans le cas du *Citrus* le changement de la source carbonée est suffisant (Gavish *et al.*, 1991).

Les cellules induites par ces différents facteurs passent par de nombreuses modifications cytologiques pour arriver à un état dit de réactivation cellulaire. Les premières modifications sont la migration du noyau en position latérale ainsi que la migration de chloroplastes vers ce même noyau (cellule en cours de réactivation). Puis le noyau, entouré de sa couronne de chloroplastes, se déplace vers le centre de la cellule (cellule réactivée). Les cellules réactivées présentent donc un noyau très volumineux et dense, dû à une augmentation de la synthèse d'ADN et/ou à une augmentation de la transcription, en position centrale (Blervacq *et al.*, 1995), d'où part un réseau de microtubules en forme d'étoile. Ces multiples modifications ont pour rôle de préparer les cellules à entrer en division.

A partir d'un certain seuil de réactivation, les cellules réactivées n'ont plus besoin des stimuli externes utilisés lors de l'induction pour poursuivre leur redifférenciation (De Jong *et al.*, 1993). Les cellules réactivées peuvent alors se diviser pour donner le futur embryon somatique.

2.2. La première division des cellules embryogènes

Lors de la reproduction sexuée, la première division du zygote est généralement asymétrique et donne naissance à une petite cellule apicale qui formera le futur embryon et à une grande cellule basale qui deviendra le suspenseur (Cresti *et al.*, 1992). Ce tissu qui connecte l'embryon à la plante est rarement observé au cours de l'embryogenèse somatique (Ho *et al.*, 1993 ; Emons *et al.*, 1993). Cependant chez la carotte, il a été suggéré que certaines cellules de cals auraient une fonction semblable à celle du suspenseur en reliant entre elles les petites cellules des masses pré-embryogènes (Emons *et al.*, 1992) ou encore chez *Stevia rebaudiana*, certains embryons possèdent un pseudosuspenseur (Filho *et al.*, 1997). De telles structures ont également été observées chez des embryons somatiques d'épicéa (Fowke *et al.*, 1990 ; Tautorius *et al.*, 1992). Il faut noter qu'au cours de l'embryogenèse somatique, de nombreuses variations des premières divisions ont été rapportées. Toutefois, la division asymétrique (Dijak *et al.*, 1988) reste plus fréquemment observée que la division symétrique (Trigano *et al.*, 1989). Suite à la première division asymétrique, le développement de l'embryon somatique sera similaire à celui de l'embryon zygotique alors qu'après une division symétrique, il sera plus proche du développement de la cellule apicale du zygote (Toonen *et al.*, 1994).

3. Les phases tardives: stades quadrant à cotylédonaire

Le développement de l'embryon somatique est similaire à celui de l'embryon zygotique et passera par les mêmes phases de développement (Dodeman *et al.*,

1997). Le développement de l'embryon passe par différents stades (figure 1) qui sont chez les Angiospermes dicotylédones, les stades globulaire (figure 1-D), cordiforme (figure 1-E, 1-F), torpille (figure 1-G) et cotylédonaire (figure 1-H, 1-I, 1-J). Lors de ces stades, de nombreux événements vont permettre la mise en place des différents axes et structures de l'embryon. Après la première division asymétrique (figure 1-A), trois étapes sont déterminantes: le stade octant (figure 1-C), la formation du protoderme (figure 1-D) premier tissu différencié caractéristique du stade globulaire et l'initiation du méristème caulinaire et racinaire (figure 1-H) dès le stade torpille.

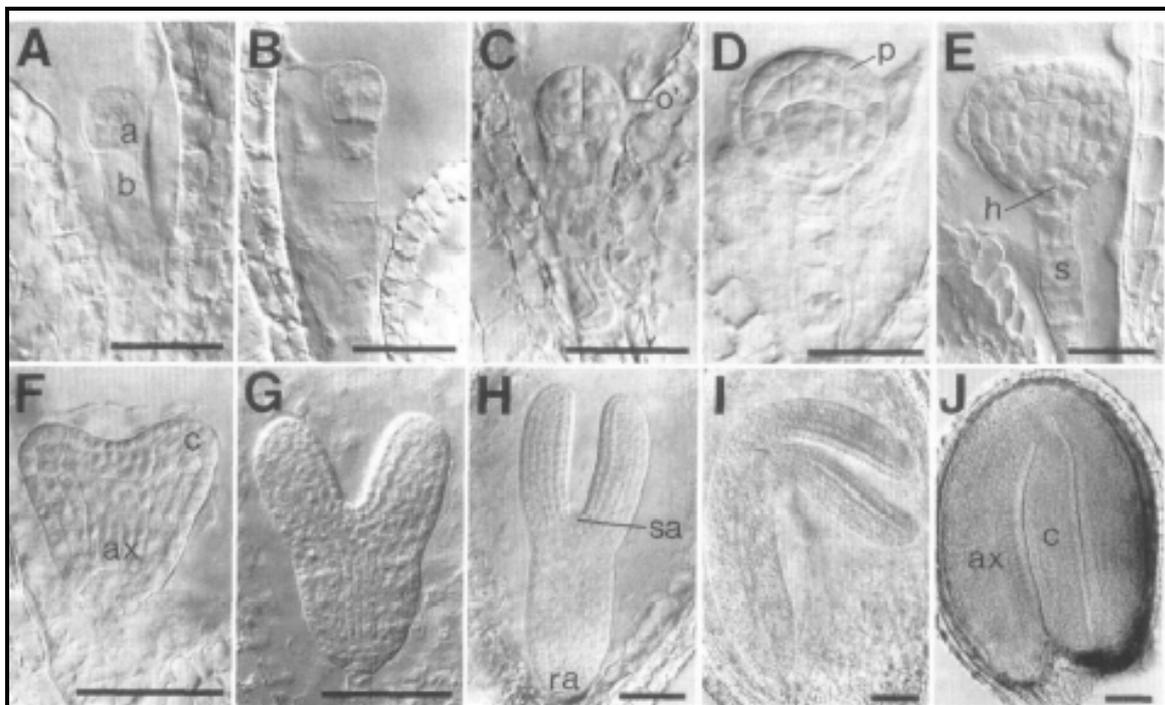


Figure 1: Stades de développement de l'embryogenèse zygotique chez *Arabidopsis thaliana* (D'après West *et al.*, 1993). A : première division asymétrique du zygote. a: cellule apicale, b: cellule basale ; B: Embryon stade deux à quatre cellules; C: stade octant (o'); D: stade globulaire dermatogène. p: protoderme; E: Embryon en phase de transition au stade cœur. h: hypophyse, s: suspenseur; F: Embryon stade cœur. ax: axe de l'embryon, c : cotylédon; G: Embryon stade torpille; H: Embryon stade cotylédonaire. sa: apex caulinaire (shoot apex), ra: apex racinaire; I: Incurvation des cotylédons; J: Embryon mature. Barre A-E : 25 μm et F-J: 50 μm .

La cellule apicale, issue de la première division (figure 1-A), se divise successivement sans grandissement cellulaire. Les deux premières divisions sont longitudinales et conduisent à l'obtention de quatre cellules dont la division transversale donne le stade octant (West *et al.*, 1993). Les divisions suivantes sont périclines (parallèles à la surface de l'embryon). A la suite de ces divisions périclines, les cellules périphériques sont destinées à former le premier tissu histologiquement détectable de l'embryon : le protoderme. Le protoderme est constitué des cellules périphériques dont l'identité cellulaire se déterminera pour former l'épiderme. Ce tissu permet l'isolement du futur embryon des cellules voisines et du milieu extérieur (Filonova *et al.*, 2000). La formation du protoderme est essentielle pour la suite des phases du développement de l'embryon. Un des rôles du protoderme est de limiter l'expansion cellulaire. Le contrôle de l'expansion cellulaire joue un rôle important dans le développement de l'embryon comme le montre le mutant *emb 101-1* d'*Arabidopsis* où l'expansion cellulaire est incontrôlée provoquant l'obtention d'une cellule géante occupant tout l'espace de la graine (De Jong *et al.*, 1993). D'autre part, le protoderme aurait un rôle morphogène par l'émission de signaux de nature protéique. La capacité d'expansion cellulaire est contrôlée par la paroi cellulaire via la structure même de la paroi et par sa composition en protéines et en systèmes enzymatiques. La formation de ce protoderme détermine le stade globulaire.

Du stade globulaire au stade cotylédonaire, l'embryon poursuit son développement et met en place les différents méristèmes. A partir du stade globulaire on peut observer une augmentation de la taille de l'embryon et du nombre de cellules suite à des divisions anticlines du protoderme (perpendiculaire à la surface de l'embryon) puis par des divisions longitudinales et transversales des cellules internes au protoderme. La transition du stade globulaire au stade cœur est marquée par une transformation morphologique importante de

l'embryon. Au niveau latéral de l'embryon globulaire, des régions spécifiques subissent des divisions parallèles à la surface de l'embryon. Ces divisions provoquent l'émergence de deux lobes correspondant aux primordias cotylédonaire. Ainsi l'embryon passe d'une symétrie radiale à une symétrie bilatérale formée par l'axe hypocotyle-radicule de l'embryon. Ces structures se développent en longueur par divisions et expansions cellulaires. D'autres structures ou tissus peuvent être discernés au stade cœur, comme le procambium et le méristème fondamental.

Certaines études montrent aussi des similitudes au niveau moléculaire entre l'embryogenèse somatique et zygotique. Dahmer *et al.* (1992) montrent que chez le soja les embryons somatiques et les embryons zygotiques expriment la globuline 11S de manière similaire. Chez cette même plante, Perez-Grau *et al.* (1989) montrent que la localisation *in situ* de l'ARNm Kti3 est identique au niveau des embryons somatiques et zygotiques. Il en est de même pour l'expression du gène *LEAFY COTYLEDON1 (LEC1)* chez la carotte (Yazawa *et al.*, 2004).

4. La maturation des embryons et la dormance

Au stade cotylédonaire, l'embryon zygotique interrompt son développement et rentre en phase de maturation, caractérisée par la synthèse et le stockage de protéines de réserve, de lipides et de polysaccharides (Zimmerman, 1993). Ces réserves sont accumulées préférentiellement au niveau des cotylédons. La synthèse de protéines diminue au moment où l'embryon zygotique rentre dans la phase de dessiccation conduisant à la dormance de l'embryon (Thomas, 1993). Chez le maïs, les embryons somatiques ont besoin d'une phase de maturation en présence de saccharose. Pendant cette période, l'amidon est accumulé dans les cellules du scutellum et la formation de lignine est stoppée comme chez l'embryon

zygotique (Emons *et al.*, 1993 ; Mulder *et al.*, 1993). Chez la carotte, Timmers (1993) a montré que les embryons somatiques au stade torpille et les embryons zygotiques en germination étaient constitués de cellules vacuolisées riches en amyloplast. D'autre part, il a été démontré que les embryons somatiques et zygotiques d'épicéa avaient les mêmes capacités d'accumulation de protéines (Hakman *et al.*, 1990 ; Joy *et al.*, 1991). Si l'accumulation de réserves est observée au cours de l'embryogenèse somatique, la dormance quant à elle n'est pas observée. Ainsi les embryons somatiques continuent leur développement pour donner une plantule. Cette absence de dormance est l'une des limites dans la création et l'utilisation de graines artificielles.

Qu'elle soit somatique ou zygotique, l'embryogenèse nécessite donc de nombreuses modifications physiologiques, moléculaires et structurales. Dans les différents processus du développement, la paroi évolue fortement au point de vue de sa composition mais aussi au niveau de sa structure. Au niveau de l'embryogenèse zygotique ou somatique, la paroi est sujette à une régulation importante et est à l'origine de la perception de l'environnement, donc des stimuli externes mais aussi des molécules signal (Malinowski *et al.*, 2002). Ainsi l'étude de la paroi au cours de l'embryogenèse somatique semble très intéressante.

II. La paroi cellulaire

Contrairement aux cellules animales, les cellules végétales sont enveloppées dans un réseau complexe de fibres nommé paroi cellulaire. Cette paroi possède des propriétés physiques et chimiques qui leur confèrent un rôle crucial dans la forme et la fonction de cellules végétales. En effet, la paroi participe activement, autant que la membrane plasmique, dans différents processus physiologiques de la plante. La paroi a longtemps été décrite comme une structure statique. Actuellement, de part la grande diversité de ses composants, de leur modularité et de leur interaction, la paroi est considérée comme un compartiment extracellulaire dynamique et actif. En effet, la paroi est précisément régulée et modifiée durant tout le développement de la plante. Ces modifications entraînent une modification des propriétés physiologiques de la cellule.

1. Implication de la paroi dans l'embryogenèse somatique

Située en position externe, la paroi est la première structure en contact avec le milieu et les conditions extérieures, et est ainsi impliquée dans différents processus physiologiques comme la défense, la croissance cellulaire, l'adhésion cellulaire (Knox, 1992), l'identité cellulaire, la polarité cellulaire (Quatrano *et al.*, 1997), la communication intra et intercellulaire (Brownlee, 2002) et l'embryogenèse zygotique et somatique (Malinowski *et al.*, 2002).

Durant les stades précoces de l'embryogenèse somatique, l'organisation spatiale de l'embryon est régulée par de nombreux signaux de position. Les recherches sur la nature de ces signaux ont confirmé que la paroi cellulaire participe activement au contrôle de la croissance et de la différenciation de l'embryon (Brownlee, 2002). La paroi est une structure riche en polysaccharides et en enzymes de dégradation pouvant ainsi libérer de très nombreuses molécules

de transduction. En particulier l'implication d'oligosaccharides dans la transduction de signal lors de processus physiologiques a été démontrée (Spiro *et al.*, 1998 ; Coté *et al.*, 1994).

De nombreuses informations sur les molécules impliquées dans la signalisation ont été obtenues grâce à l'étude d'un mutant d'embryogenèse somatique (mutation chimique) ts11. Ce mutant ts11 de la carotte (Giuliano *et al.*, 1984) est caractérisé par un arrêt du développement embryonnaire au stade globulaire. La reprise du développement de l'embryon peut être réalisée par l'addition, dans le milieu de culture de ts11, de protéines secrétées par une lignée sauvage embryogène. L'une de ces protéines est une endochitinase de 32 kDa (De Jong *et al.*, 1992) dont la présence dans le milieu de culture est corrélée avec un rétablissement du passage du stade globulaire au stade cœur. Les chitinases ont généralement pour substrat des motifs glucidiques de type N-Acétyleglucosamine. Les produits de dégradation générés par cette chitinase sont homologues à l'un des produits de dégradation de facteurs de nodulation (Nod), qui sont considérés comme des molécules signal au cours de la formation des nodosités racinaires (Macchiavelli *et al.*, 2004).

Les facteurs NOD, ont été montrés comme pouvant être le substrat de la chitinase (Dyachok *et al.*, 2002). Les facteurs NOD sont des composés lipophiles constitués de résidus β -1-4-N-Acétyleglucosamine de la famille des lipochitooligosaccharides (LCO). Ce type de molécule est impliqué dans l'initiation de l'embryogenèse somatique de *Picea abies* par stimulation de la division des cellules des masses pré-embryogènes (Dyachok *et al.*, 2000). Il a été montré que l'addition de chitooligosaccharides peut compenser l'absence d'auxine dans le milieu de culture. Selon les auteurs, la molécule aurait un rôle similaire à l'auxine et stimulerait l'embryogenèse somatique par induction de la division cellulaire et inhibition de la mort cellulaire dans les masses prœmbryogènes (Dyachok *et al.*,

2000). Plus spécifiquement, ce sont les produits de dégradation, les oligogalactosamines, des lipochito-oligosaccharides par la chitinase qui joueraient un rôle important dans l'embryogenèse somatique (Darvill *et al.*, 1992).

Un des autres substrats potentiels serait les arabinogalactane protéines (AGPs). Certaines de ces protéines contiennent des groupements N-acétylglucosamine pouvant servir de substrat aux chitinases (Van Hengel *et al.*, 2001). Ainsi, la dégradation des AGPs par des chitinases a été démontrée chez la carotte (Passarinho *et al.*, 2001) et chez le pin (Domon *et al.*, 2000). D'autres systèmes de dégradation existent permettant la libération de molécules pouvant influencer sur l'embryogenèse somatique.

Les pectines participent également dans le processus de signalisation lors de la croissance et du développement des plantes. Parmi la famille des pectines, ce sont les rhamnogalacturonanes (RGs) qui jouent un rôle de molécule signal similaire aux chitooligosaccharides (Fry *et al.*, 1993). Dans le cas de l'embryogenèse somatique de la chicorée, Helleboid *et al.* (2000) ont démontré l'implication de trois protéines de pathogénicité sur l'induction de l'embryogenèse et corrélé l'augmentation du nombre d'embryons avec l'augmentation du taux d'une β -1-3-glucanase de 37 kDa (Helleboid *et al.*, 1998). Cette enzyme participerait à la dégradation de la callose en unité de β -1-3-glucose dans les parois des cellules embryogènes et des jeunes embryons. Dans les suspensions de cellules du concombre (*Cucumis sativus*), l'induction de l'embryogenèse somatique est stimulée par les xyloglucane endotransglycosylases (XETs). Cette induction passe par la libération de xyloglycane participant dans la transduction de signal (Fry *et al.*, 1993 ; Vissenberg *et al.*, 2000).

2. Les différents constituants de la paroi cellulaire

La paroi est composée d'une paroi primaire dans les organes jeunes et d'une paroi secondaire dans les organes matures, séparées par la lamelle moyenne (figure 2). Les parois primaire et secondaire sont formées de structures rigides et élastiques constituées de différents réseaux de microfibrilles polysaccharidiques (Cellulose) englobés dans une matrice gélatineuse, amorphe et résistante à la compression formée principalement par la pectine et l'hémicellulose. L'ensemble est stabilisé par des protéines, glycoprotéines et des composés phénoliques (lignine) (Wojtaszek, 2000). Chacune de ces structures possède un rôle et une fonction particulière.

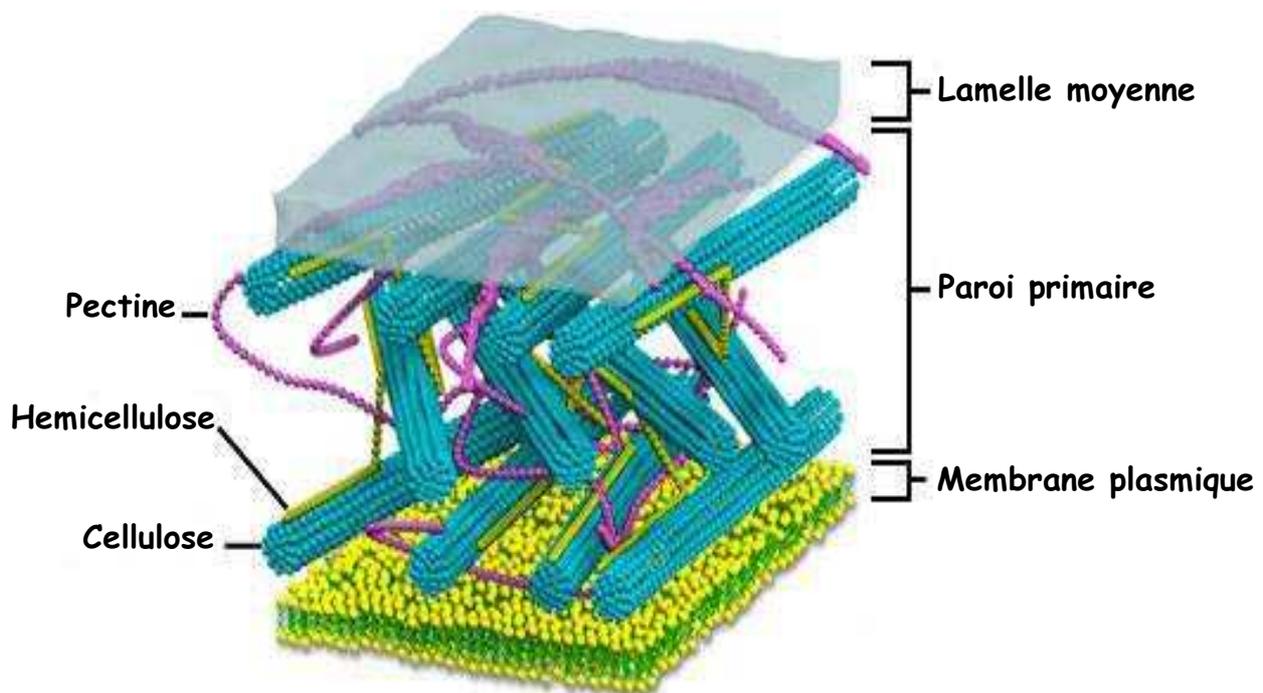


Figure 2: Schéma de la structure d'une jeune paroi végétale. (Image : International Pectin Producers Association)

La synthèse de la paroi cellulaire peut être décomposée en deux étapes. La première étape consiste en la biosynthèse de différents constituants de la paroi et la seconde est l'assemblage de ces différents éléments. Les constituants de la paroi sont synthétisés et exportés selon deux modes. Les polysaccharides, tels

que les pectines et les hémicelluloses, sont polymérisés au niveau du réticulum endoplasmique (Staehelin, 1997) et de l'appareil de Golgi (Staehelin *et al.*, 1995 ; Driouich *et al.*, 1993), et certains constituants (surtout les molécules lipophiles) sont formés dans le cytoplasme et dans les chloroplastes (Lemieux, 1996 ; Post-Beittenmiller, 1996). Ces différents composés sont ensuite sécrétés vers la paroi par exocytose. Il en est de même des protéines enzymatiques. Au contraire, la cellulose est directement élaborée et libérée par le complexe cellulose synthétase situé au niveau de la membrane plasmique (Pear *et al.*, 1996). L'assemblage complexe des différents constituants se fait à la fois grâce à l'action d'enzymes telles que l'estérase, la xyloglucane endotransglycosylase (XET) (Smith *et al.*, 1991) mais aussi par autoassemblage de la cellulose et de l'hémicellulose.

2.1. Les polysaccharides

Les polysaccharides représentent jusqu'à 90% des constituants pariétaux. Il existe trois grands réseaux de fibres : la cellulose, l'hémicellulose et la pectine (Carpita *et al.*, 1993).

La cellulose est une molécule stable, insoluble et élastique, représentant 40% des polysaccharides pariétaux. La cellulose est un polymère de cellobiose correspondant à un dimère de β -1-4-D-glucose. La synthèse se réalise au niveau de la membrane plasmique par le complexe cellulose synthétase à partir de résidus UDP-D-glucose. Le complexe enzymatique est constitué de six sous-unités en rosette formant des microfibrilles de cellulose. La fibre de cellulose est ainsi formée de plusieurs microfibrilles parallèles entre elles, de 1 à 5 micromètres de long et de 4 à 10 nanomètres de diamètre, constituées chacune de 2000 à 25000 monomères de glucose (figure 3) (Brown *et al.*, 1996 ; 2000). Les microfibrilles sont stabilisées par des liaisons hydrogène intra et interchaînes.

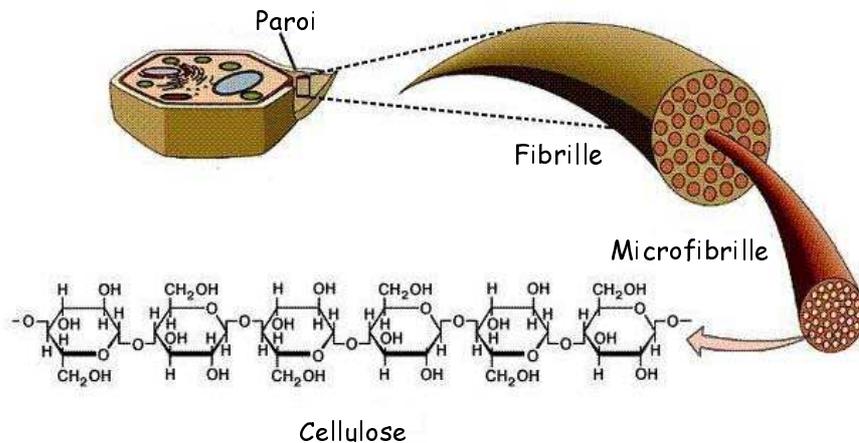


Figure 3: Modélisation de l'assemblage des fibres de cellulose. (Image : Botany visual resource library)

L'hémicellulose représente 30% des polysaccharides pariétaux. Il existe plusieurs types d'hémicellulose. Cinq groupes ont été distingués : les xyloglycanes, les xylanes, les glucomannanes, les mannanes/galactomannanes et les β -glucanes non-cellulosiques. Ces différents composés possèdent une structure commune constituée par un polymère de résidus de β -1-4-D-glycopyranose sur lequel viennent se greffer de courtes chaînes de polysaccharides de natures diverses selon leurs groupes comme par exemple du xylose, du galactose ou du mannose. Les xyloglycanes représentent le composé majeur des hémicelluloses et sont constitués de résidus de β -1-4-D-glucose dont chaque glucose est substitué en O-6 par un résidu d' α -D-xylose (Vissenberg *et al.*, 2000). Les hémicelluloses ont la capacité de se lier à la cellulose au moyen de liaisons hydrogènes et à la pectine par des liaisons covalentes (Thompson *et al.*, 2000). Ces liaisons jouent un rôle important dans l'élongation et dans la croissance cellulaire (Carpita *et al.*, 1993 ; Vissenberg *et al.*, 2000).

Les pectines représentent aussi 30% des polysaccharides pariétaux. La famille des pectines est composée d'une part par les homogalacturonanes (HG), les rhamnogalacturonanes-I (RG-I), les rhamnogalacturonanes-II (RG-II) et d'autre part les arabinanes, les galactanes et les arabinogalactanes (AG). Les HG, RG-I et RG-II possèdent un squelette commun basé sur la polymérisation de résidus d'acide α -1-4-D-galacturonique. Ces polymères possèdent de nombreuses charges négatives qui peuvent être estérifiées par des groupements méthyle ou acétyle. L'estérification se réalise au niveau de l'appareil de Golgi lors de la biosynthèse des polymères de pectine, ainsi qu'au niveau de la paroi. Le degré d'estérification influence directement la rigidité de la paroi cellulaire mais aussi certaines activités enzymatiques pariétales (Moustacas *et al.*, 1991). Les fonctions des pectines sont très nombreuses tant au niveau de la propriété et de la structure de la paroi que dans différents processus physiologiques. En effet, les pectines régulent également l'hydratation, la porosité, le pH, la charge globale et la plasticité pariétale. Les pectines ont été aussi montrées pour être impliquées dans les mécanismes de défense, de signalisation et dans l'adhésion cellulaire (Darvil *et al.*, 1992 ; Carpita *et al.*, 1993 ; Aldington *et al.*, 1993).

2.2. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques sont caractéristiques des cellules différenciées. Le principal composé phénolique étudié est la lignine. Elle est formée par copolymérisation de différentes unités de monolignoles que sont l'alcool coumarylique, l'alcool coniférylique et l'alcool sinapylique (Boudet, 2000). La composition de la lignine peut être très variable du fait de l'addition de différentes unités de phénylpropanoïde tels que l'acide phénolique ou cinnamaldéhyde (Ralph *et al.*, 1998). La lignine forme de nombreuses liaisons avec les autres polymères pariétaux. Ces liaisons donnent une structure rigide et non

extensible à la paroi et constituent une barrière difficilement franchissable pour la pénétration de pathogènes.

2.3. Les enzymes et protéines pariétales

2.3.1. Les enzymes pariétales

De nombreuses enzymes sont associées avec la paroi (Cassab & al 1988 ; Fry, 1995). Certaines comme les endoglucanases (E.C. 3.2.1.4), les xylosidases (E.C. 3.2.1.37), les pectinases (E.C. 3.2.1.15) et les pectines méthylestérases (PMEs. E.C. 3.1.1.11) ont des activités permettant de modifier la structure pariétale par action sur les différents polysaccharides ou par modification d'autres substrats grâce, par exemple, aux invertases, à des peroxydases (E.C. 1.11.1.7), des phosphatases ou diverses déshydrogénases. Le degré de plasticité de la paroi est régulé par des protéines telles que les expansines et les Xyloglucanes Endo-Transglycosylases (XETs) qui permettent l'expansion cellulaire provoquée par la pression de turgescence (Cosgrove, 1999). La paroi est aussi la première barrière de défense, et possède donc à ce titre une panoplie d'enzymes telles que des chitinases (E.C. 3.2.1.14) et des β -1-3-glucanases (E.C. 3.2.1.6) dans le but de se défendre contre les agressions de différents pathogènes.

2.3.2. Les protéines pariétales

La paroi comprend un grand nombre de protéines structurales dont les protéines riches en glycine (GRPs) et les glycoprotéines riches en hydroxyprolines (HRGPs). La superfamille des HRGPs, analogues aux protéoglycanes animaux, comprend quatre familles majeures : les glycoprotéines riches en proline (PRPs), les extensines, les lectines et les arabinogalactane protéines (AGPs) (Showalter, 1993 ; Nothnagel, 1997 ; Sommer-knudsen *et al.*, 1998). Les HRGPs sont

caractérisées par une ossature protéique riche en hydroxyproline. Ces résidus sont substitués par des liaisons O-glycosidique d'arabinose et de galactose.

2.3.2.1. Les GRPs

Les GRPs ont une structure primaire riche en glycine (70%), construite sur la répétition d'un motif Gly-X (Showalter, 1993) ou X représente une glycine le plus fréquemment mais peut-être aussi une alanine ou une sérine (Ringli *et al.*, 2001). Ces protéines, comme la GRP1.8 du haricot, sont retrouvées préférentiellement au niveau des parois des cellules du phloème et du protoxylème (Ryser, 2003). Les GRPs peuvent également se lier aux extensines par l'intermédiaire de liaisons isodityrosines (Showalter *et al.*, 1991), mais aussi peut-être avec les PRPs, du fait de leur co-localisation et par la présence de régions d'interaction protéine-protéine chez les GRPs (Sachetto-Martins *et al.*, 2000). Les GRPs ont un rôle structural dans l'élasticité et dans la résistance des parois des cellules vasculaires. Elles sont impliquées aussi dans les réactions de défense, de stress (Showalter, 1993) et dans les mécanismes de symbiose (Kevei *et al.*, 2002).

2.3.2.2. Les extensines

Les extensines sont de la famille des glycoprotéines riches en hydroxyproline (HRGPs). Chez les dicotylédones, les extensines sont des protéines basiques abondantes qui se caractérisent par une richesse en hydroxyproline et en sérine mais aussi en d'autres acides aminés comme la Val, Tyr, Lys et His et par une répétition du motif Ser-Hyp₄, où les hydroxyprolines contiguës de ces motifs sont O-glycosylés par des résidus d'arabinose (1 à 4 résidus) et les sérines par un résidu unique de galactose. Le caractère basique, conféré par la richesse en résidus de lysine, permet l'interaction des extensines avec les groupements acides des pectines (Miller *et al.*, 1992). Des liaisons intramoléculaires de type isodityrosine et des liaisons diphénylether intermoléculaires ont été identifiées,

favorisant ainsi l'interaction entre les différentes molécules d'extensines. D'autres liaisons, telles que protéine-ose ou protéine-protéine, peuvent exister comme pour une protéine HHRGPs du maïs (Kieliszewski *et al.*, 1992b) qui, par sa richesse et la présence de résidus d'histidine contigus (doigt Zinc), permet de former via des liaisons métalliques des interactions intra ou intermoléculaires. L'ensemble de ces interactions et la force des différentes liaisons suggèrent que ces protéines joueraient un rôle important dans la rigidité de la structure pariétale et donc participeraient à la régulation de la croissance cellulaire ou encore dans des réactions de défense. Cette dernière fonction serait permise par l'augmentation des liaisons intermoléculaires formant une barrière impénétrable, mais aussi médiée par une activité d'agglutination entre les pathogènes et les extensines via l'interaction ionique des charges positives des extensines et les charges négatives de surface des pathogènes (Van holst *et al.*, 1984).

2.3.2.3. Les lectines et PRPs

Les lectines des Solanacées et les PRPs sont des glycoprotéines structurellement proches des extensines. Les lectines sont une classe unique de glycoprotéines végétales capables d'agglutiner des oligomères de N-acétylglucosamine. Ces glycoprotéines sont constituées de 50% de monosaccharides, principalement composées de tétra-arabinose liés au niveau d'hydroxyprolines, et de 50% de protéines riches en quatre acides aminés : hydroxyproline, sérine, glycine et cystéine. Les domaines riches en glycine et cystéine permettent l'interaction avec les oligomères de N-acétylglucosamine de la paroi cellulaire et de pathogènes.

L'appartenance des lectines à la famille des extensines leur confère les mêmes fonctions et rôles que ces dernières (Showalter, 1993). D'autres rôles leur sont attribués comme le transport des sucres, le contrôle de la division cellulaire

ou encore la stabilisation des protéines de réserve (Showalter *et al.*, 1989 ; Sommer-knudsen *et al.*, 1998).

Les PRPs se caractérisent par la répétition de motif Pro-Pro ou d'un pentapeptide Pro-Pro-X-Y-Lys où X est généralement une Val, His, Thr ou Ala et Y est normalement une Tyr, Thr, Glu ou une Pro, et par une faible substitution carbonée. Les PRPs contiennent une quantité équimolaire de proline et d'hydroxyproline, où l'hydroxyproline se situe toujours en seconde position au niveau du pentapeptide (Pro-Hyp-X-Y-Lys) (Lindstrom *et al.*, 1991).

2.3.2.4. Les AGPs

Une autre classe des protéines de la superfamille des HRGPs est celle des AGPs. Elles sont généralement très solubles (hydrophile). La structure de ces protéines diffère de celle des extensines et PRPs par le caractère relativement acide de la partie protéique qui ne représente que de 1 à 10% de la masse totale de la glycoprotéine, parfois même moins de 1% (Osman *et al.*, 1995) et par sa grande richesse en oses. De par leur composition, les AGPs sont comparés aux mucines et aux glycosyl-amino glycanes (GAGs) (Bacic *et al.*, 2000) observés dans le règne animal. Les AGPs ont été montrés pour être impliqués dans de nombreux processus physiologiques dont l'embryogenèse somatique comme par exemple chez la carotte (Kreuger *et al.*, 1995).

III. Les AGPs

L'étude des AGPs a été entreprise depuis le début du XIX^{ème} siècle (1810). Elles ont été mises en évidence pour la première fois dans les sécrétions de gommes, surtout de gommes arabiques. Ces gommes étaient très étudiées du fait de leur utilisation dans de nombreux domaines comme la médecine, la peinture et l'industrie. La mise en évidence des AGPs a pu se développer fortement grâce à la création du β -glucosyl phenylazo (1, 3,5-tris [4- β -D-glucopyranosyl-oxyphenylazo] 2, 4,6-trihydroxybenzene), un colorant connu sous le nom β -D-glycosyl de Yariv (Yariv *et al.*, 1962) (figure 4). Cette molécule qualifiée d'antigène artificiel de synthèse de la classe des phénylglycosides permet de précipiter spécifiquement les AGPs. Toutefois, l'interaction entre ces deux molécules reste mal connue (Yariv *et al.*, 1967).

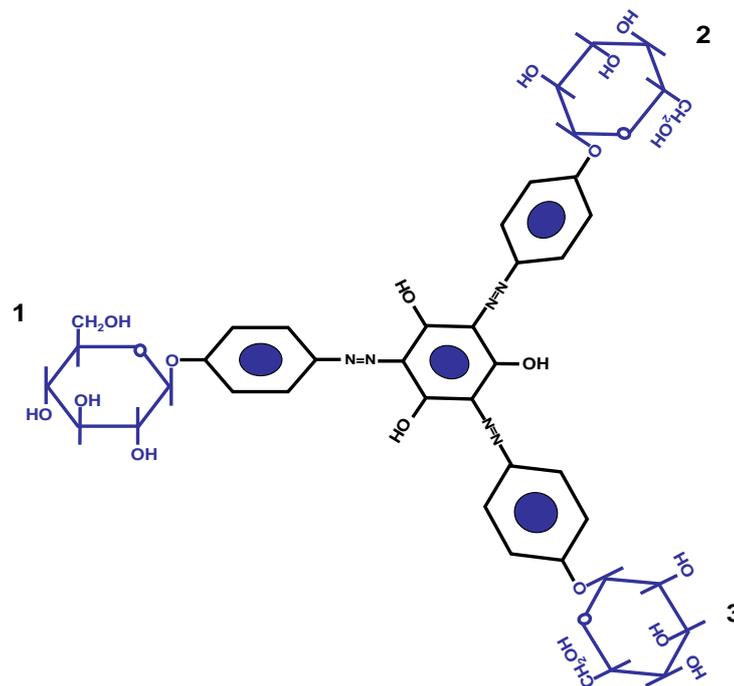


Figure 4: Structure chimique du réactif de YARIV. Les trois sucres terminaux (1, 2, 3) sont essentiels dans la liaison aux AGPs. Si les sucres en 1, 2, 3 sont des β -D-glucosides, la structure forme le (α -D-glucosyl)³ Yariv pouvant interagir avec les AGPs. Alors que le (β -D-galactosyl)³ Yariv, constitué par des α -D-galactosides ne se lie pas aux AGPs. (D'après Showalter, 2001)

1. La structure des AGPs

Les AGPs sont des glycoprotéines dont les parties protéique et glycanique ont une structure caractéristique.

1.1. L'ossature protéique

Le corps protéique des AGPs est caractérisé par la richesse en cinq acides aminés: alanine, sérine, glycine, thréonine et hydroxyproline/proline qui peuvent représenter plus de 80% des acides aminés. Deux classes d'AGPs peuvent être subdivisées selon la structure de leur ossature protéique : les AGPs « classiques » et les AGPs « non-classiques » (Gaspar *et al.*, 2001).

L'ossature protéique des AGPs classiques, comme les AGP-Pc1 du pin (Chen *et al.*, 1994), AGP-Na1 du tabac (Du *et al.*, 1994), Bn Sta 39-3 et 39-4 du colza (Gerster *et al.*, 1996) et LeAGP1 de la tomate (Li *et al.*, 1996), est constituée de trois domaines (Figure 5) :

- Une extrémité N-terminale hydrophobe possédant une séquence signal de sécrétion vers le réticulum endoplasmique, cette partie sera absente chez la protéine mûre.
- Une partie centrale riche en hydroxyproline/proline, alanine, thréonine, sérine et glycine. Cette partie centrale est le lieu privilégié des O-glycosylations.
- Une extrémité C-terminale hydrophobe constituant une hélice transmembranaire. La partie C-terminale est très importante puisqu'elle est impliquée dans l'addition d'une ancre Glycosyl-Phosphatidylinositol (GPI) permettant un ancrage des AGPs au niveau membranaire (Schultz *et al.*, 1998).

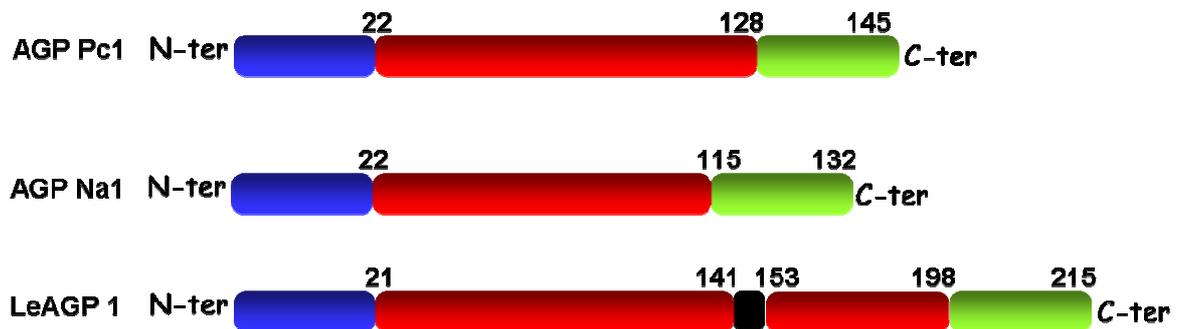
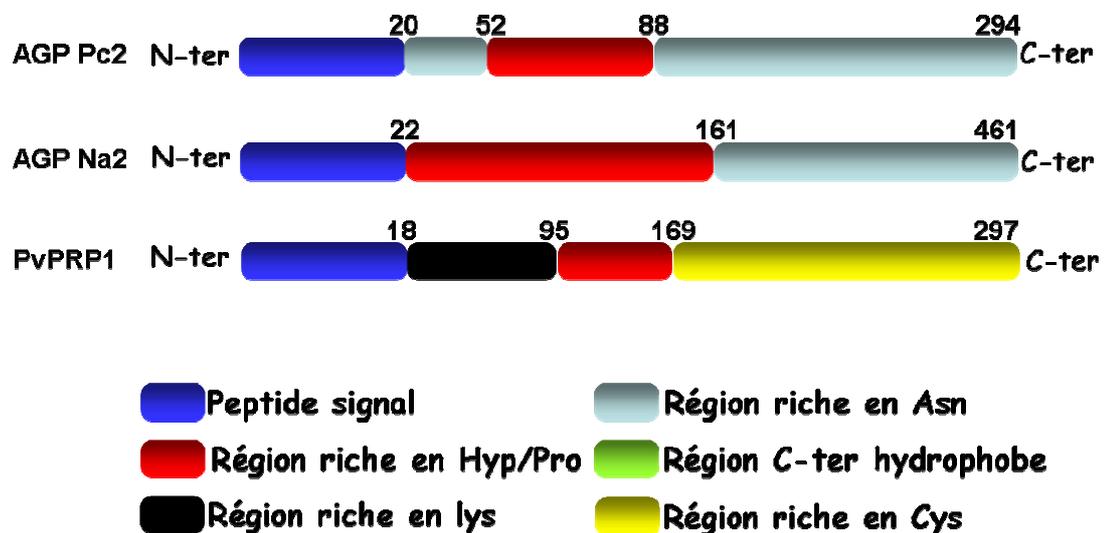
A: Structure des AGPs classiques**B: Structure des AGPs non-classiques**

Figure 5: Classification des AGPs selon leur structure protéique. A: Structure des AGPs classiques. Exemple: AGP *Pc1* (Chen *et al.*, 1994), AGP *NA1* (Du *et al.*, 1994) et *LeAGP 1* (Li *et al.*, 1996). B: Structure des AGPs non-classiques. Exemple: AGP *Pc2* (Mau *et al.*, 1995), AGP *Na2* (Mau *et al.*, 1995) et *PvPRP1* (Sheng *et al.*, 1991) (D'après Showalter, 2001).

De nombreux gènes d'AGPs ont été isolés chez plusieurs espèces comme *Arabidopsis thaliana* (Schultz *et al.*, 2000 ; Sherrier *et al.*, 1999), ou chez le pin (Loopstra *et al.*, 2000 ; Zhang *et al.*, 2000). Les AGP-GPIs représentent plus de 16% des protéines GPI (Borner *et al.*, 2002 ; 2001). Chez *Arabidopsis thaliana*, 47 séquences d'AGPs classiques ont été isolées et classées en quatre sous-groupes:

13 AGPs classiques (AtAGP1 à AtAGP7, AtAGP9 à AtAGP11 et AtAGP25 à AtAGP27), 10 AG peptides (AtAGP12 à AtAGP16, AtAGP20 à AtAGP24), 3 AGPs riches en lysine (AtAGP17 à AtAGP19) et 21 AGPs de type fascicline-like (AA1 à AtFLA21) (Schultz *et al.*, 2002). Les AG peptides sont des AGPs composées de 10 à 13 acides aminés. Les AGPs riches en lysine possèdent une courte région riche en lysine. Les AGPs de type fascicline-like présentent un ou deux domaines fasciclins (FLAs). Ces domaines sont homologues aux protéines de fasciclins de la drosophile (Elkins *et al.*, 1990) connus pour jouer un rôle majeur dans l'adhésion cellulaire. Sur les 47 AGPs, 35 sont des AGPs dites classiques, et sont prédites pour être des AGP-GPIs.

Les AGPs non-classiques telles que l'AGP-Pc2 du pin (Mau *et al.*, 1995), l'AGP-Na2 et PvPRP1 du tabac (Mau *et al.*, 1995 ; Chen *et al.*, 1993) ont comme point commun avec les AGPs classiques la présence en N-terminal d'un peptide signal. En revanche, elles diffèrent par l'absence d'une extrémité C-terminale hydrophobe et par leur composition dont le domaine riche en hydroxyproline/proline n'est pas le seul motif. D'autres motifs riches en cystéine, en asparagine ou en lysine peuvent être rencontrés, et représentent la plus grande partie du corps protéique. De par l'absence de l'extrémité C-terminale, les AGPs non-classiques ne sont jamais prédites pour être de AGP-GPIs.

1.2. La partie glycanique

Les AGPs sont constituées d'une ossature protéique sur laquelle viennent se fixer de manière covalente des chaînes polysaccharidiques, constituées majoritairement de monosaccharides d'arabinose (L-arabinofuranose: Araf) et de galactose (D-galactopyranose: Galp). Ces chaînes sont constituées principalement par des structures carbonées nommées arabinogalactane de type II (figure 6). Ce motif carboné est constitué de chaînes β -1-3-D galactopyranoside qui sont

substituées au niveau du carbone 6 par des chaînes de β -1-6-D galactopyranoside. Ces dernières chaînes sont terminées généralement par des monosaccharides de type α -L-arabinofuranosyl ou par d'autres motifs comme le D-glucose, L-fucose, D-mannose, D-xylose, L-rhamnose, D-glucosamine, acide D-glucuronique et acide D-galacturonique (Nothnagel, 1997).

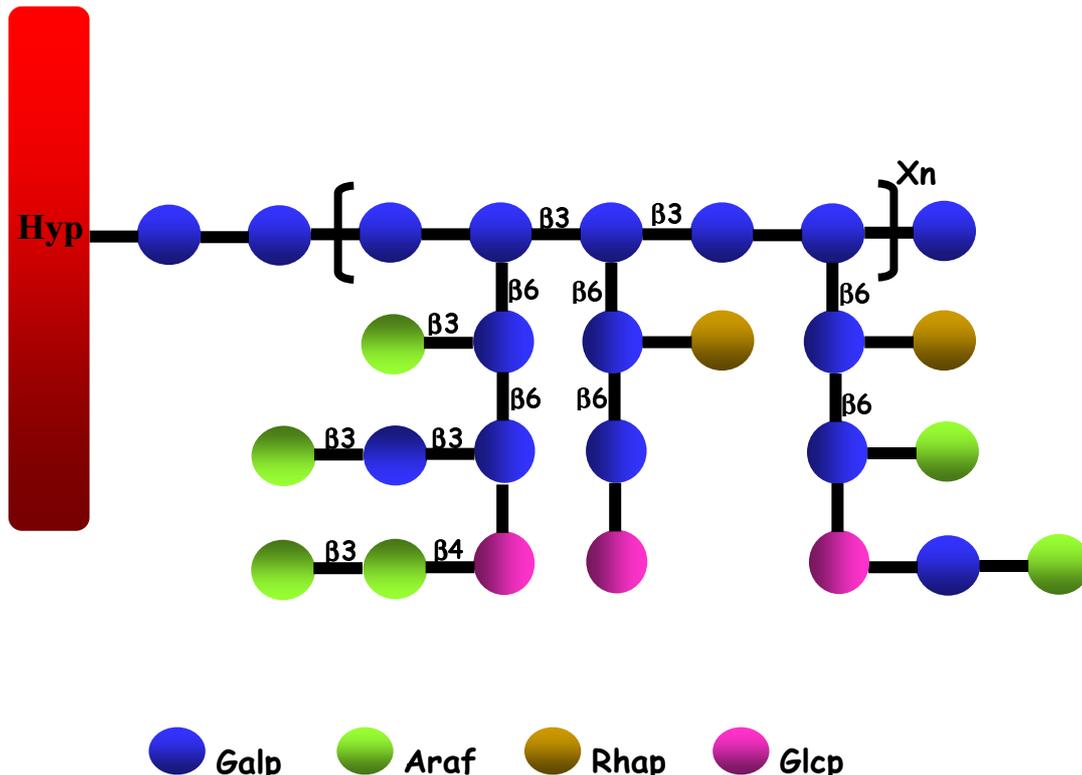


Figure 6: Structure des chaînes d'arabinogalactanes de type II. (D'après Gaspar, 2001b)

2. Les modifications post-traductionnelles

Les AGPs sont notamment modifiées de façon post-traductionnelle par trois grandes modifications successives telles que l'hydroxylation des résidus proline, la glycosylation et l'addition d'une ancre GPI (pour les AGPs classiques).

2.1. Hydroxylation des prolines

Les AGPs font partie des Hydroxyproline-Rich-Glycoproteins, ainsi les résidus de proline sont hydroxylés au niveau du réticulum endoplasmique pour former des résidus d'hydroxyproline. Ces hydroxylations ont un rôle très important, puisqu'elles seront essentielles pour permettre les glycosylations futures. Environ 80% des résidus proline sont modifiés par la prolyl 4-hydroxylase (E.C 1.14.11.2), enzyme tétramérique constituée de deux sous-unités catalytiques α (65 KDa) et de deux sous unités β (60 KDa) (Bolwell *et al.*, 1986). Les prolines modifiées sont généralement situées dans des motifs polyproline II (Tanaka *et al.*, 1980 ; 1981) ou sur les prolines situées à côté de certains acides aminés. Ainsi les prolines dans les motifs suivants Ala-Pro, Pro-Ala, Pro-Pro, Pro-Val et Ser-Pro seront hydroxylées alors que les résidus de proline contenus dans les motifs Lys-Pro, Tyr-Pro et Phe-Pro ne seront jamais modifiés (Kieliszewski *et al.*, 1994, Sommer-Knudsen *et al.*, 1998). La variété de séquences permettant l'hydroxylation des prolines permet de penser qu'il existe plusieurs formes de prolyl hydroxylases. Ainsi Bolwell & al (1986) ont pu mettre en évidence quatre formes majeures des sous-unités α et β chez *Phaseolus vulgaris*. Chez *Arabidopsis thaliana*, sept gènes codent pour des sous-unités α de la prolyl 4-hydroxylase (GenBank accession number : AC011623, AF024504, AL01986, AB026644, AC004450, AL031032 et AC026234) (Wojtaszek *et al.*, 1999).

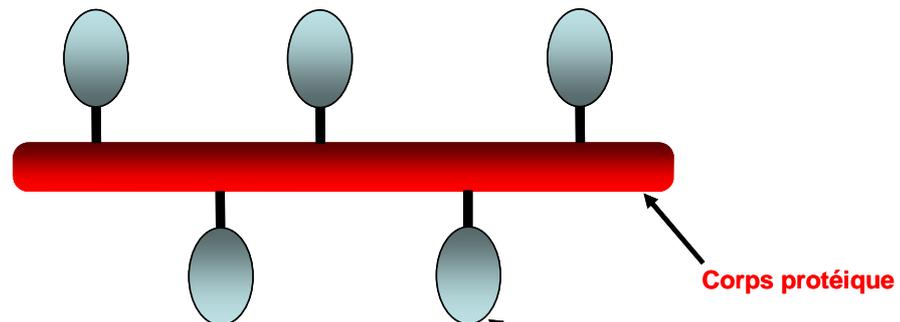
2.2. Glycosylations

D'après la structure polysaccharidique complexe des AGPs, la glycosylation fait appel à de très nombreuses enzymes de type glycosyl-transférase (GTs). Les glycosylations s'effectuent au niveau de l'appareil de Golgi. Les substitutions en polysaccharides sont généralement constituées par un corps d'une chaîne de 30 à 150 résidus de 1-3 β -D-galactopyranose substitués en C(O)6 par une courte

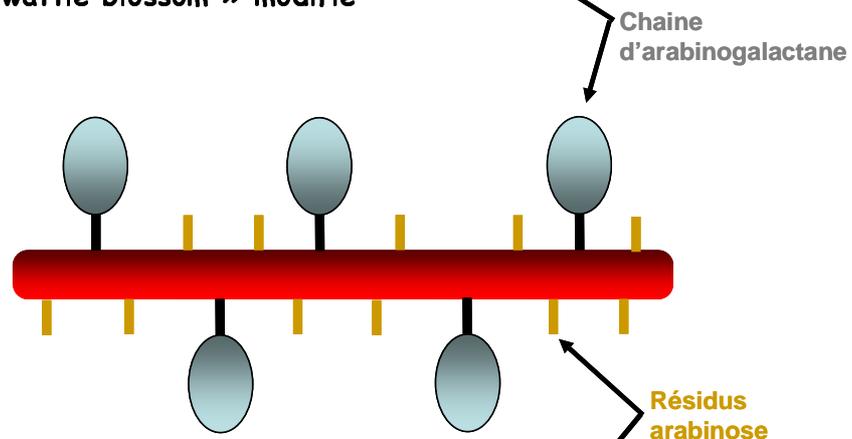
chaîne de 1-6 β -galactopyranose et par de simples chaînes d'arabinose. Ces motifs se lient à la protéine préférentiellement au niveau des hydroxyprolines par des liaisons O-glycosidiques. Ces glycosylations ne sont pas aléatoires mais suivent une règle précise se basant sur l'hypothèse des hydroxyprolines contiguës. Cette hypothèse est basée sur le principe que les hydroxyprolines contiguës sont glycosylées par des chaînes courtes d'arabinose et les hydroxyprolines isolées sont glycosylées par des motifs d'arabinogalactanes (Kieliszewski *et al.*, 1994 ; Zhao *et al.*, 2002). Les N-glycosylations sont rares mais existent comme dans le cas de LeAGP-1 et PtX14A9 dont les séquences possèdent des sites de N-glycosylation. Cependant, il n'a pas été déterminé si ces sites sont utilisés ou non (Li *et al.*, 1996).

Deux modèles de conformation et de la disposition des chaînes d'arabinogalactanes sur le corps protéique sont proposés (figure 7) : le modèle « wattle-blossom » (Finscher *et al.*, 1983) et le modèle « twister hairy rope » (Qi *et al.*, 1991). Dans le premier modèle, les chaînes d'arabinogalactanes forment des unités globulaires, contrairement au second où les arabinogalactanes forment de courtes chaînes pouvant se replier de manière parallèle au corps protéique. Le modèle « wattle-blossom » a été récemment précisé (Showalter, 2001) avec la présence d'unité d'arabinose, comme dans le modèle « twister hairy rope » sur le corps protéique en plus des chaînes d'arabinogalactanes. La microscopie électronique à transmission montre l'existence de ces deux modèles. Le modèle «twister hairy rope» est retrouvé dans les AGPs de la gomme arabique (Qi *et al.*, 1991) et le modèle « wattle-blossom » chez certaines AGPs de carotte (Baldwin *et al.*, 1993).

A-Modèle « wattle blossom »



B-Modèle « wattle blossom » modifié



C- Modèle « twister hairy rope »

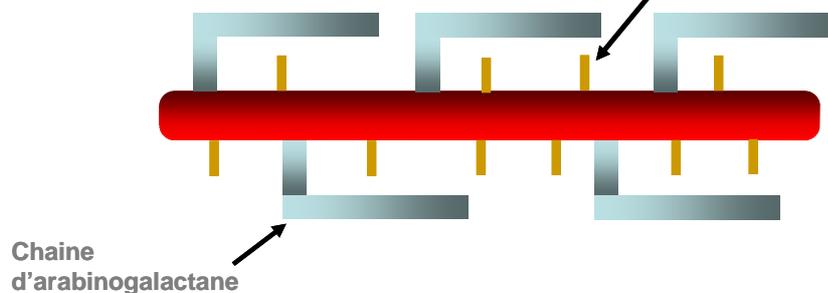


Figure 7: Modélisation de la partie glycanique des AGPs. (D'après Showalter, 2001)

2.3. Addition d'une ancre GPI

L'addition d'une ancre glycosylphosphatidylinositol à l'extrémité C-terminale, pour la classe des AGPs classiques, est rencontrée après modification post-traductionnelle. L'addition de cette ancre GPI donne naissance à une sous-

famille d'AGPs nommée AGP-GPIs, qui ainsi présenteront de nouvelles caractéristiques et donc de nouvelles propriétés. Les AGPs sont une des classes de protéines végétales présentant une ancre GPI (Youl *et al.*, 1998 ; Takos *et al.*, 1997). L'addition de cette ancre est possible grâce à l'existence de trois domaines (figure 8). Le premier domaine est une courte séquence consensus composée de trois acides aminés aliphatiques consécutifs respectivement nommés ω , $\omega+1$ et $\omega+2$, le second est une courte région basique (spacer de 4 à 8 acides aminés) et enfin le troisième domaine est une région hydrophobe (14 à 18 acides aminés). La séquence consensus ω , $\omega+1$, $\omega+2$ n'est pas définie par une séquence conservée. Cependant, le résidu en ω est toujours un résidu de Ser, Asn, Ala, Gly, Asp ou Cys, l'acide aminé situé en $\omega+1$ peut être n'importe lequel sauf Pro et Tryp alors que pour $\omega+2$ le résidu est plutôt une Ala, Gly, Thr ou Ser (Udenfriend *et al.*, 1995). Le site d'ancrage de l'ancre GPI s'effectue au niveau de l'acide aminé ω .

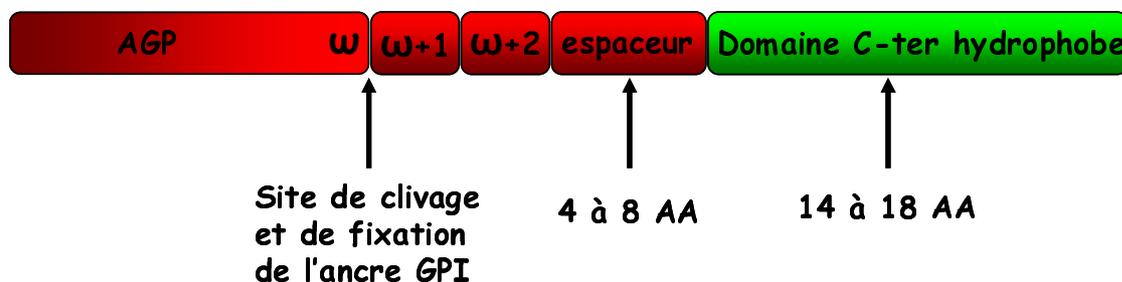


Figure 8 : Séquence consensus pour l'addition d'une ancre GPI. (D'après Showalter, 2001)

Chez les animaux, l'ancre GPI est constituée par l'assemblage d'un phosphatidylinositol, d'un tétrasaccharide et par une phosphoryléthanolamine (Figure 9). Le tétrasaccharide est composé par une structure minimale de D-Man α (1-2)-D-Man α (1-6)-D-Man α -(1-4)-D-GlcNH $_2\alpha$. Le phosphatidylinositol peut être lié à un diacylglycérol, alkylacylglycérol ou une céramide, groupement essentiel pour l'ancrage au sein de la membrane plasmique.

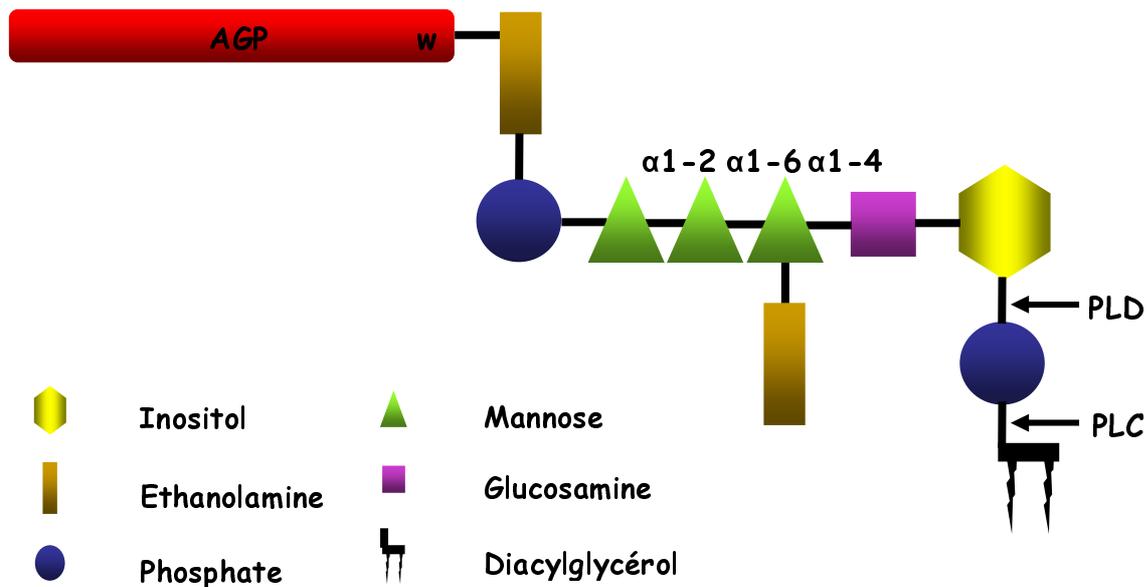


Figure 9: Structure de l'ancre GPI. (D'après Gaspar *et al.*, 2001b)

L'ancre GPI est synthétisée et ajoutée aux protéines au niveau du réticulum endoplasmique (figure 10) (Schultz *et al.*, 1998). La première étape de cette synthèse des ancras GPI fait intervenir un complexe d'enzymes glycosyltransférases : PIG-A, PIG-C, PIG-H et GPI (Kinoshita *et al.*, 1997 ; Kinoshita *et al.*, 2000 ; Watanabe *et al.*, 1998). Ce complexe transfère la N-acétylglucosamine (GlcNac) sur le phosphatidylinositol (PI). Puis l'enzyme PIG-L dé-N-acétyle le N-acétylglucosamine-phosphatidylinositol (GlcNac-PI) en glucosamine-phosphatidylinositol (GN-PI) (Watanabe *et al.*, 1999). Trois résidus mannose (M) et phosphoryléthanolamine (PE) sont respectivement ajoutés sur l'ancre à partir du dolichol-phosphate-mannose (DPM). Les enzymes DPM1 (mannoylphosphodolichol synthétase) et SL15 (suppresseur lectine 15) peuvent faciliter la formation du DPM. Enfin, les protéines PIG-B et PIG-F transfèrent le mannose et la phosphoryléthanolamine à partir du DPM (Takahashi *et al.*, 1996 ; Hong *et al.*, 2000). Les liaisons entre la protéine et l'ancre GPI se réalisent entre l'extrémité COOH de la glycoprotéine et l'éthanolamine finale de l'ancre, par une réaction de transamidation.

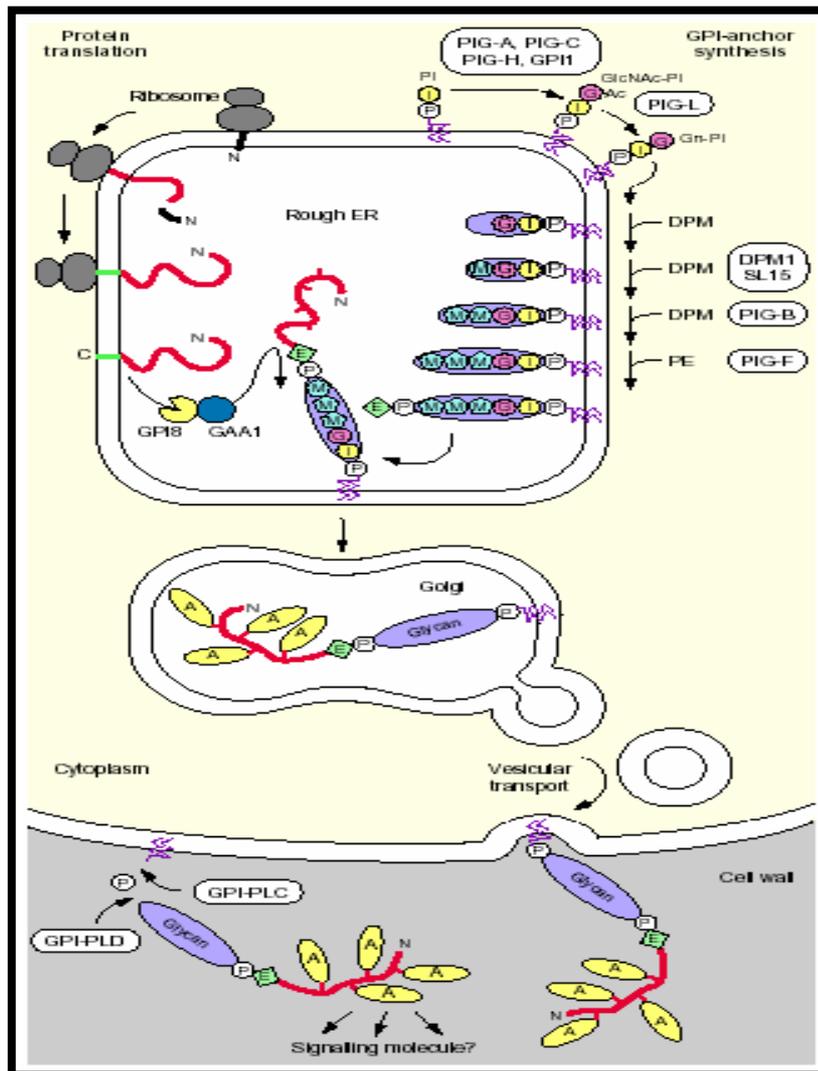


Figure 10: Voie de synthèse et addition de l'ancre glycosylphosphatidylinositol. (D'après Schultz *et al.*, 1998)

Le complexe GPI transamidase est composé de deux protéines GAA1 et GPI8 (Ohishi *et al.*, 2000). Cette dernière est une protéine homologue à la famille des protéases à cystéine et constitue la partie catalytique du complexe enzymatique permettant le clivage de la partie C-terminale de la protéine. La protéine GAA1 est requise pour le transfert de la protéine sur l'ancre GPI. Chez les plantes, il existe des enzymes similaires permettant la synthèse d'AGP-GPI (Eisenhaber *et al.*, 2001 ; 2003). Après l'addition de cette ancre, les protéines migrent vers la membrane plasmique via les vésicules golgiennes de sécrétion.

La disposition des protéines à ancre GPI ne s'effectuerait pas de façon homogène à la surface de la membrane plasmique mais elles seraient rassemblées au niveau de micro-domaines riches en lipides (Simons *et al.*, 1997) tels que les sphingolipides et le cholestérol. Cette disposition serait expliquée par l'interaction entre les sphingolipides, le cholestérol et les longues chaînes carbonées saturées trouvées typiquement sur les ancres GPI (Schroeder *et al.*, 1994). Ces domaines sont décrits pour être impliqués dans de nombreux processus cellulaires comme la transduction de signaux (Cary, 2000).

Le rôle principal de ces protéines à ancre GPI serait d'être un moyen de répartir les différents récepteurs ou agents activateurs de récepteur à la surface de la membrane plasmique (Sharom *et al.*, 2004). Toutefois, ces protéines sont la cible de clivage par la phospholipase C ou D, qui permet ainsi la libération d'une partie protéique et de molécules de nature lipidique. Ce clivage joue un rôle très important puisqu'il peut permettre l'activation de l'activité enzymatique. En effet, la présence de l'ancre GPI peut modifier la conformation de la protéine et donc inhiber son activité, comme dans le cas de la 5' nucleotidase chez *Bacillus thuringiensis* (Sharom *et al.*, 1996).

La partie GPI joue aussi un rôle important, puisque lors du clivage par la phospholipase il y a libération d'inositolphosphoglycane (IPG) et de diacylglycérol (DAG). L'IPG est un second messenger connu pour être libéré lors de stimulation par l'insuline ou par les facteurs de croissance (Nazih *et al.*, 1998). L'IPG sera alors à l'origine, après passage dans le cytosol, du contrôle d'un éventail important de fonctions cellulaires en interagissant avec des kinases et des phosphatases (Anderson, 1993), tandis que le DAG est un activateur des protéines kinases.

3. Lieux d'expression des AGPs

Actuellement, plusieurs techniques permettent de localiser la présence d'AGPs. Ces méthodes sont basées sur la révélation des AGPs par le β -D-Glc Yariv, par des anticorps spécifiques (tableau 1) ou par des techniques d'hybridations moléculaires. L'étude des AGPs a permis d'établir qu'elles sont présentes dans tout le règne végétal, aussi bien chez les Angiospermes, les Gymnospermes que chez les plantes inférieures (Bryophytes et Algues) (Nothnagel, 1997 ; Fincher *et al.*, 1983). Au niveau des organes, les AGPs sont trouvées à la fois dans les feuilles, les tiges, les racines (Ding *et al.*, 1997), le tube pollinique (Roy *et al.*, 1998), la partie florale (Majewska-Sawka *et al.*, 2000), les styles (Gane *et al.*, 1995) et dans la graine (Suzuki *et al.*, 2002). Au niveau cellulaire, les AGPs sont détectées au niveau des membranes plasmiques et des parois cellulaires ou encore sécrétées dans les espaces intercellulaires (Nothnagel, 1997 ; Knox *et al.*, 1991). Les AGPs sont retrouvées également au niveau intracellulaire et dans des vésicules. Cette multilocalisation reflète le « turn-over » des AGPs (Herman *et al.*, 1992). Chez *Phaseolus vulgaris*, l'utilisation d'hydroxyproline radio-marquée comme précurseur permet de retrouver la radioactivité dans les fractions d'AGPs après cinq minutes avec une demi-vie des AGPs de 10 à 15 min (Van Holst *et al.*, 1981). Ce turn-over rapide est rendu possible par une synthèse rapide des AGPs ainsi que par leur libération dans le milieu extracellulaire (Darjania *et al.*, 2002).

Les AGPs sont, de par leur structure protéique et osidique, des macromolécules complexes, variées et stables. Elles permettent l'obtention d'une grande hétérogénéité en taille et en charge. Les AGPs peuvent résister à des conditions extrêmes comme des hautes températures et des traitements alcalins (Kreuger *et al.*, 1996). L'emploi d'anticorps, spécifiques de la partie glycanique

(tableau 1) des AGPs, permet de déterminer des patrons d'AGPs spécifiques d'un organe, d'un tissu ou d'un stade de développement (Schinlder *et al.*, 1995).

Tableau 1: Anticorps anti-AGP et leurs épitopes.

Auteurs	Type d'anticorps et épitopes connus
Kikuchi & al., 1993	(1,6)- β -D-galactotetraose oligosaccharide
Smallwood & al., 1996	LM2 Résidu β -D-glucuronopyranosyl
Pennell & al., 1989 Yates & al., 1996	JIM13, JIM4 β -D-GlcpA-(1-3)- α -D-GalpA-(1-2)-L-Rha
	MAC207 β -D-GlcpA-(1-3)- α -D-GalpA-(1-2)-L-Rha reconnaît principalement les AGPs membranaires
	Type d'anticorps et épitopes inconnus
Kreuger & Van Holst, 1995 Pennell & al., 1989, 1991 Knox & al., 1991 Norman & al., 1990 Kjellbom & al., 1997	ZUM 15, ZUM 18 JIM8 JIM 14 PN16.4B4 Ox-FB8
Anticorps contre l'ossature protéique	
Gao & al., 1999	<u>PAPAPSKGKVKGKKGKKHNA</u> (anticorps PAP)
Gao & al., 1999	LeAGP1 Reconnaît un épitope de 15 acides aminés, riche en Lysine, sans résidu Proline. Anti-AGP type classique.
Gaspar & al., 2001a, 2001b	AtAGP17- AGP riche en Lys : PALTKHKKKTKKHKTAP

De plus, les AGPs présentent un patron d'expression temporelle, c'est-à-dire que les AGPs exprimées peuvent être différentes au cours d'un événement physiologique. Ainsi, chez la tomate, l'ARN messenger LeAGP-1 est trouvé dans les

jeunes fruits mais pas dans les fruits plus âgés (Li *et al.*, 1996). De même, l'ARN messager PvPRP1 du tabac n'est plus détecté en réponse à un traitement d'élicitation (Sheng *et al.*, 1991).

La localisation, la structure et l'expression spatio-temporelle des AGPs suggèrent donc des fonctions et rôles particuliers.

4. Rôles des AGPs

Les rôles des AGPs sont très divers. Une des premières fonctions des AGPs serait de servir d'acteur de l'identité cellulaire ou de développement. En effet, les AGPs peuvent être spécifiques d'organes, de tissus ou de cellules mais aussi évoluer pendant le développement (Pennell *et al.*, 1989 ; 1990 ; 1991). Les autres rôles décrits font intervenir les AGPs dans tous les processus physiologiques liés à la croissance, au développement et à la différenciation cellulaire. Ainsi, les AGPs ont été montrées comme impliquées dans la croissance du tube pollinique du lis et du tabac (Mollet *et al.*, 2002 ; Wu *et al.*, 2000), l'expansion cellulaire de la rose et d'*Arabidopsis* (Serpe *et al.*, 1994 ; Willats *et al.*, 1996), ou l'épaississement de la paroi secondaire des cellules de la tomate (Gao *et al.*, 2000). Au niveau du développement et de la différenciation, les AGPs semblent jouer un rôle dans le développement des graines chez la tomate et l'avoine (Lu *et al.*, 2001 ; Suzuki *et al.*, 2002), la différenciation des cellules du mésophylle en trachéides chez le *Zinnia* (Motosé *et al.*, 2001), la mort cellulaire programmée de cellules en suspension chez *Arabidopsis* et des cellules BY-2 du tabac (Gao *et al.*, 1999 ; Chaves *et al.*, 2002) et dans l'embryogenèse somatique du pin (Egertsdotter *et al.*, 1995) et de la carotte (Kreuger *et al.*, 1995 ; Thompson *et al.*, 1998).

5. Modes d'action des AGPs

Il est admis que les AGPs sont impliquées dans de nombreuses étapes du développement des végétaux. Cependant, à ce jour, les mécanismes d'action des AGPs restent toujours obscurs. De nombreuses hypothèses ont été faites sur les modes d'action des AGPs. En effet, de part leur localisation, leur nature et leur structure, certains types d'AGP comme les AGP-GPIs sont susceptibles d'avoir de multiples voies d'action. Cinq modèles ont été proposés par Showalter (2001).

Le 1^{er} mode d'action des AGPs est basé sur leur richesse en oligosaccharides (figure 11-A). Les AGPs libres ou membranaires peuvent être la cible de nombreux systèmes enzymatiques de dégradation des oligosaccharides ou monosaccharides. Or ces structures osidiques sont considérées comme des activateurs de récepteurs membranaires impliqués dans la transduction de signaux. Dans le cas de l'embryogenèse somatique de la carotte, il a été démontré que des motifs N-acétylglucosamine et glucosamine, libérés par action d'une chitinase sur une fraction d'AGPs (Van Hengel *et al.*, 2001), participent à l'initiation de l'embryogenèse somatique. De même, l'oligosaccharide β -Lara_f-(1→3)- α -L-Ara_f-(1→3)- β -D-Galp_p-(1→6)-D-Gal retrouvé dans la structure des AGPs chez le riz, est impliqué dans le développement de l'anthere (Kawaguchi *et al.*, 1996), la partie protéique pouvant servir de molécule signal. Cependant, exceptés quelques AGPs, comme la LeAGP1 où le domaine riche en lysine n'est pas glycosylé, l'ossature protéique est très fortement glycosylée et donc ne permet pas d'interaction directe. De ce fait, une déglycosylation semble nécessaire afin de permettre l'intervention de motifs peptidiques. Cependant, les mécanismes de déglycosylation *in vivo* des AGPs restent peu connus.

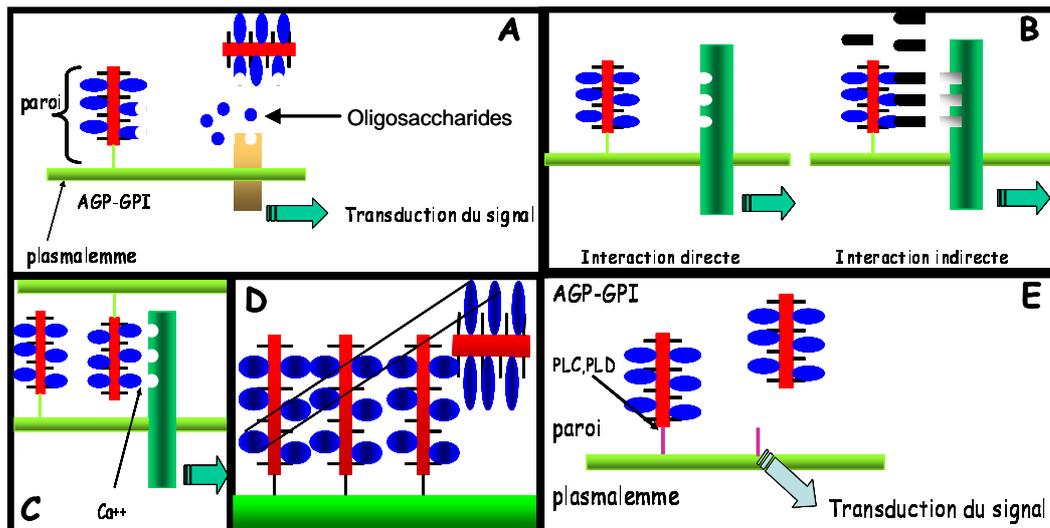


Figure 11: Modèles des différentes modalités d'action des AGPs. (D'après Showalter, 2001)

D'après le second modèle, les AGPs pourraient interagir en tant que glycoprotéines directement ou indirectement avec des récepteurs membranaires (figure 11-B), comme certains protéoglycanes dans le règne animal. Par exemple la contactine, protéine GPI des neurones, interagit avec une protéine transmembranaire Caspr (contactin associated protein) dont le domaine cytoplasmique est impliqué dans la voie de transduction du signal (Peles *et al.*, 1997). Pour le cas indirect, les AGPs collecteraient des ligands et les présenteraient aux récepteurs appropriés. Chez l'animal, le FGF (Fibroblast growth factor) est piégé par l'héparine HSPG (heparin sulfate proteoglycan), puis est présenté en dimère au récepteur FGF (Schlessinger *et al.*, 1995), dont l'affinité est plus grande que le ligand seul.

Les troisième et quatrième modèles proposent un rôle dans l'interaction et la communication intercellulaire. Dans ces modèles, les AGPs peuvent se lier soit à d'autres AGPs membranaires (figure 11-D), soit à des récepteurs situés au niveau des cellules voisines (figure 11-C). Toutefois, la capacité de transduction du signal lors de l'interaction AGP-AGP n'est pas bien établie, hormis peut-être par déstabilisation de la membrane et l'ouverture de canaux calciques.

La cinquième hypothèse est spécifique aux AGP-GPIs et plus particulièrement à l'ancre GPI (figure 11-E). Ce type d'AGPs est la cible potentielle pour certains systèmes enzymatiques comme les phospholipases C ou D ou encore des chitinases. Ces digestions permettent la libération d'oligosaccharides, AG-peptides, d'AGPs, mais aussi de phosphatidylinositol, de céramides, d'IPG et de DAG, molécules connues pour jouer le rôle de seconds messagers.

6. Les intérêts et applications des AGPs

Les AGPS ont d'une part des applications industrielles importantes comme par exemple la confection de colles, de lubrifiants, de colorants et d'additifs alimentaires. D'autre part, les AGPs sont de plus en plus étudiées pour leur intérêt médical. En effet, plusieurs études mettent en évidence des activités antibactériennes ou immuno-stimulatrices des AGPs et de leurs dérivés. Ainsi, Alban & al (2002) et Diallo & al (2001) montrent respectivement chez *Echinacea purpurea* et *Entada africana* que certains polysaccharides, provenant d'AGPs, stimulent l'activité du complément.

IV. La Chicorée plante modèle de l'ES

La chicorée est une plante traditionnellement associée aux pratiques culturelles du Nord-Pas-de-Calais. C'est donc naturellement que les sélectionneurs se sont intéressés à cette plante. Depuis 1988, notre laboratoire s'intéresse à la biologie du développement avec la chicorée comme plante modèle.

La culture de la chicorée a été introduite en France vers 1920 par les agriculteurs belges. La culture de la chicorée pour la production d'endive, occupe une place importante dans l'agriculture du Nord de la France. En effet, 80% de la production d'endives en France est concentrée dans la région Nord-Pas-de-Calais, correspondant à une surface agraire de 8000 ha (12000 ha au niveau national). La production de racine de chicorée, pour l'année 2002 a été de 168 750 tonnes. Dans le Nord-Pas-de-Calais, une grande partie de la production de chicorée industrielle est exploitée par le groupe LEROUX (FINALER) installé à Orchies (source : Florimond Desprez). Si la chicorée est essentiellement cultivée dans le Nord de la France pour sa racine qui est utilisée pour la production d'endives et de boissons, la production de la chicorée dans le monde trouve de nouveaux intérêts économiques de par sa richesse en fibres et en polymères de fructose.

1. La chicorée

La chicorée est une plante herbacée, dicotylédone de la famille des Astéracées qui se développe dans les régions à climat tempéré. La chicorée sauvage est une plante vivace (Sechley *et al.*, 1991) connue depuis environ six mille ans, elle était appréciée des plus grands médecins et botanistes grecs pour ses vertus thérapeutiques, employée pour les maux de ventre, de foie et des reins. La chicorée est appelée aussi « héliotrope », « barbe de capucine » ou

« fiancée du soleil ». La chicorée sécrète un suc laiteux amer et tonique contenant de la lactucine comme le salsifis, le pissenlit et la laitue.

Trois espèces de chicorée sont présentes en Europe : *Cichorium spinosum* L., *Cichorium endivia* L. et *Cichorium intybus* L. Si *Cichorium spinosum* est peu cultivée du fait d'un intérêt agronomique peu important, *Cichorium endivia* et *Cichorium intybus* sont deux espèces très cultivées. En effet, *Cichorium endivia*, qui a un cycle de vie annuel, est cultivée pour la consommation de ses feuilles en salade (scarole ou chicorée frisée). *Cichorium intybus*, quant à elle, peut avoir plusieurs cycles de vie: annuelle, bisannuelle ou vivace. On distingue deux variétés, la variété *foliosum* (dite Witloof) cultivée en tant que plante bisannuelle pour la production de chicons et la variété *sativum* (dite variété Magdebourg ou chicorée industrielle) cultivée en tant que plante annuelle afin de récolter la racine, qui est torréfiée.

La culture bisannuelle de la chicorée Witloof (*Cichorium intybus* L. var *foliosum*), aussi appelée chicorée de Bruxelles, est une déviation du cycle naturel (figure 12). Semée en avril mai, dès la première année, la plante développe une rosette de feuilles puis une racine pivotante tubérisée (septembre à octobre). Durant cette période de croissance végétative, la racine accumule des réserves azotées (40% de protéines et 60% d'acides aminées) et carbonées (Limani *et al.*, 1993).

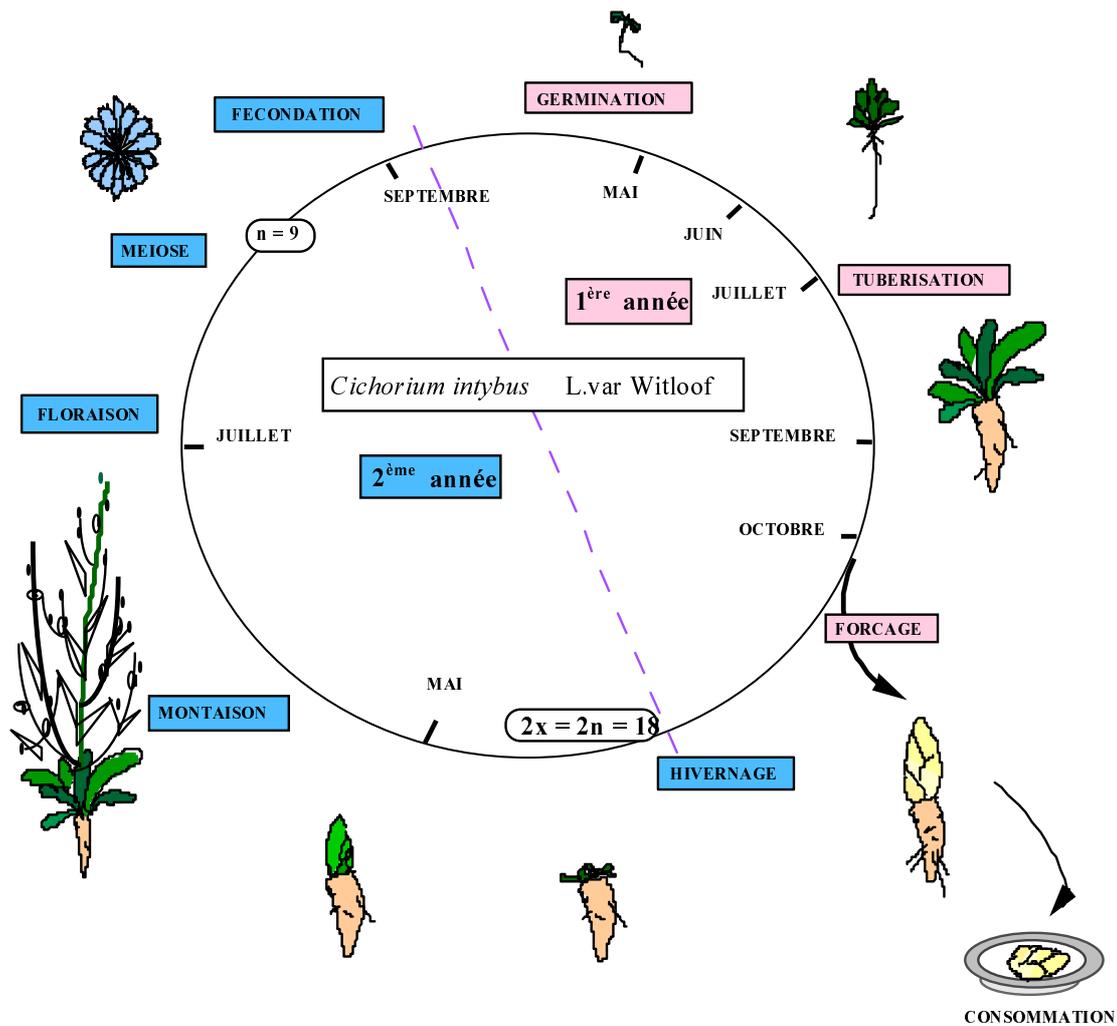


Figure 12: Cycle biologique et agronomique de la chicorée.

Le cycle naturel peut être interrompu en fin de phase végétative. Les feuilles composant la rosette sont coupées et les racines sont récoltées. Celles-ci sont conservées à 4°C, puis soumises au forçage en les plaçant dans des conditions de culture hydroponique (18°C, obscurité, hydrométrie saturante). Ce traitement permet de produire à partir du bourgeon central de la rosette et après 21 jours de forçage, un bourgeon étioilé de seconde génération: l'endive ou chicon.

2. Contextes scientifiques et objectifs

2.1. Contextes scientifiques

Depuis 1988, le laboratoire de Physiologie de la Différenciation Végétale s'intéresse à la compréhension des mécanismes du développement précoce de l'embryon somatique. Pour cela, un modèle d'ES a été optimisé à partir de différents explants de chicorée. La capacité à obtenir des embryons somatiques a été d'abord observée chez un hybride interspécifique nommé « 474 ». Les travaux sur l'hybride « 474 » ont permis de mettre en évidence une embryogenèse somatique directe que ce soit à partir des styles (Dubois *et al.*, 1988), d'anthers (Guedira *et al.*, 1989), de racines (Guedira *et al.*, 1990) ou de feuilles (Dubois *et al.*, 1991). L'induction et l'expression de l'ES sont réalisées dans un milieu de culture de Murashige & Skoog modifié (1962) en présence des vitamines de Morel & Wetmore (1951), par addition de saccharose (Guedira *et al.*, 1990 ; Robatche-Claive, 1991) et ceci sous agitation, à l'obscurité et à 35°C (Décout *et al.*, 1994). Il a été montré qu'il était possible d'obtenir une relative synchronisation de la première division embryogène par addition de glycérol dans le milieu de culture lors des premiers jours de culture (Robatche-Claive *et al.*, 1992 ; Bellettre *et al.*, 1999).

Les travaux menés au laboratoire se focalisent principalement sur les phases précoces de l'ES de la chicorée, en particulier sur la réactivation des cellules cibles et sur l'engagement de ces cellules dans la voie embryogène. Les faibles taux de cellules compétentes à l'embryogenèse somatique, qui chez la carotte ne sont que de 1% (De Jong *et al.*, 1993), ont conduit les scientifiques à rechercher des molécules impliquées dans ce processus. Ainsi, plusieurs protéines ont été mises en évidence chez la chicorée dont des chitinases, une osmotin-like protein et une thaumatin-like protein (Helleboid *et al.*, 1998 ; 2000).

D'autres marqueurs non protéiques ont été identifiés comme la callose (β -1,3-glycane) dont un dépôt est observé au niveau des parois des cellules réactivées (Dubois *et al.*, 1990).

Les nombreux marqueurs pariétaux trouvés ont orienté les recherches du laboratoire vers les modifications de la paroi au cours de l'ES (Chapman *et al.*, 2000a, b). L'observation d'un réseau filamenteux recouvrant l'embryon préglobulaire, nous a amené à faire un parallèle avec des structures observées chez les animaux : le glycocalyx. Chez les animaux, les glycosyl-amino glycanes (GAGs) sont connus pour être impliqués dans les phénomènes d'adhésion et de communication cellulaires. Or un embryon somatique doit d'une part s'isoler des autres cellules de l'explant et d'autre part fédérer ses cellules et les amener à se comporter comme une entité embryonnaire. Les molécules analogues aux GAGs sont les AGPs (Bacic *et al.*, 2000). Nous avons pu établir la présence d'AGPs dans ce réseau filamenteux mais aussi montrer leur implication dans l'identité cellulaire du protoderme de l'embryon globulaire (Chapman *et al.*, 2000c). Enfin, Chapman & al (2000c) ont montré que les AGPs étaient retrouvées dans le milieu de culture de l'hybride « 474 » et que l'addition du β -D-Glc Yariv provoque une diminution notable du nombre d'embryons somatiques.

2.2. Objectifs

La première partie du travail, qui m'a été confié, était de confirmer le lien entre l'embryogenèse somatique et la libération des AGPs dans le milieu de culture. Nous avons ainsi mis en place deux approches complémentaires :

- La quantification des AGPs issues de culture de génotypes embryogène « 474 », peu embryogène Pévèle et non embryogène Flash.

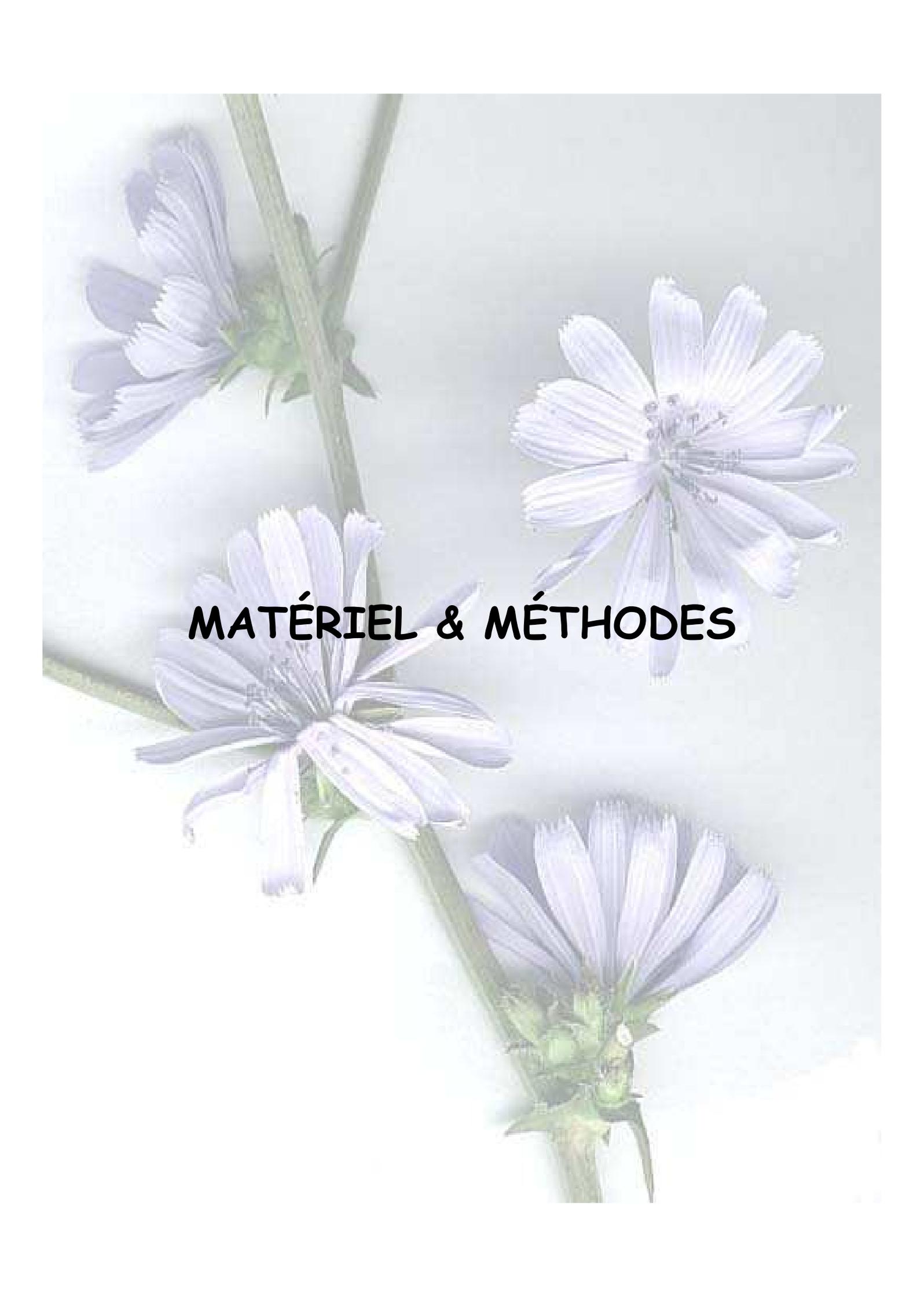
- La quantification des AGPs issues de culture de génotypes embryogène « 474 », peu embryogène Pévèle ou non embryogène Flash ayant subi préalablement un prétraitement permettant l'augmentation du nombre d'embryons (Moreew *et al.*, 2005 publication soumise).

Nous avons ensuite cherché à isoler la ou les AGPs spécifiques de l'embryogenèse somatique. Pour cela, nous avons utilisé plusieurs techniques comme l'HPLC et l'immunolocalisation avec des anticorps dont les épitopes sont spécifiques de la partie glycanique présente sur les AGPs. Pour vérifier si le fait d'être libérées conférait aux AGPs un rôle dans l'ES, nous nous sommes intéressés à la possibilité de modifier la capacité embryogène par modification du milieu de culture grâce à l'apport de différentes molécules dont les AGPs sont constituées. Cette expérience était basée sur des travaux réalisés par d'autres équipes et démontrant que de nombreux systèmes enzymatiques de dégradation sont exprimés au cours de l'embryogenèse somatique chez la chicorée mais aussi chez la carotte.

La deuxième partie de mon travail a consisté à réaliser une analyse cytologique du processus en présence ou non du β -D-Glc Yariv afin de connaître les phases précises inhibées par le réactif de Yariv. Nous avons aussi étudié les différentes phases du processus de l'ES avec la cinétique d'accumulation des AGPs au cours de la culture.

Les AGPs sont classées en deux classes distinctes dont celle des AGPs dites classiques connues pour être des protéines à ancre GPI. Afin de vérifier si les AGPs libérées au cours de l'ES sont des AGP-GPIs, nous avons utilisé d'une part une gamme d'inhibiteur permettant l'inactivation des phospholipases responsables de la libération des protéines à ancre GPI, et d'autre part une

technique de dérivation afin de mettre en évidence la présence d'une ancre GPI sur les AGPs libérées au cours de l'ES.

The image features four purple flowers on green stems, arranged in a cross-like pattern. The flowers have many thin, pointed petals. The background is a light, neutral color. The text 'MATÉRIEL & MÉTHODES' is centered over the image in a bold, black, sans-serif font.

MATÉRIEL & MÉTHODES

MATERIEL ET METHODES

I. MATERIEL

Le matériel biologique utilisé au cours de cette thèse a évolué au fur et à mesure des résultats obtenus.

Dans la première partie, le matériel végétal utilisé, comme génotype embryogène, est un hybride interspécifique appelé « 474 », issu du croisement *Cichorium intybus* L. var. *sativa* cv. Koospol (Ets Florimond-Desprez, France) x *Cichorium endivia* L. var. *latifolia* cv. Catalane (Ets Vilmorin, France). Les génotypes non ou peu embryogène sont respectivement Pévèle *Cichorium intybus* L. var. *sativum* cv. Magdebourg et Flash *Cichorium intybus* L. var. *foliosum* cv. Flash.

Dans la seconde partie des travaux, nous avons utilisé les génotypes *Cichorium intybus* L. var. *sativum* cv. Koospol nommés K59 et K28 respectivement embryogène et non embryogène. Le parent intybus de l'hybride « 474 » est également issu de cette population Koospol. Les génotypes K sont considérés comme des frères-sœurs possédant ainsi un fond génétique similaire, ce qui n'était pas le cas de l'hybride interspécifique « 474 ».

II. METHODES

1. Mise en culture pour l'obtention d'embryons somatiques

Les embryons somatiques sont obtenus par mise en culture de fragments foliaires (plantes *in vivo*, feuille adulte) ou racinaires (plantes *in vitro*, plantule de six semaines) en présence de 20 ml de milieu de culture M17S20 (annexe 1) en présence ou non de glycérol. Pour les feuilles, la culture se déroule en deux

étapes. La première étape est une phase d'induction pendant quatre jours en milieu M17S20 contenant du glycérol (J0-J4). L'utilisation du glycérol permet de synchroniser les cellules en voie d'acquisition de l'embryogenèse somatique. La seconde étape est une phase d'expression de l'embryogenèse somatique. Cette phase s'effectue en transférant les fragments foliaires dans un milieu M17S20 sans glycérol (J4-J4+7). Pour les racines, aucune synchronisation n'est possible, ainsi la mise en culture ne s'effectue qu'en présence de M17S20 sans glycérol et pendant une durée de huit jours (J0-J8) (figure 13).

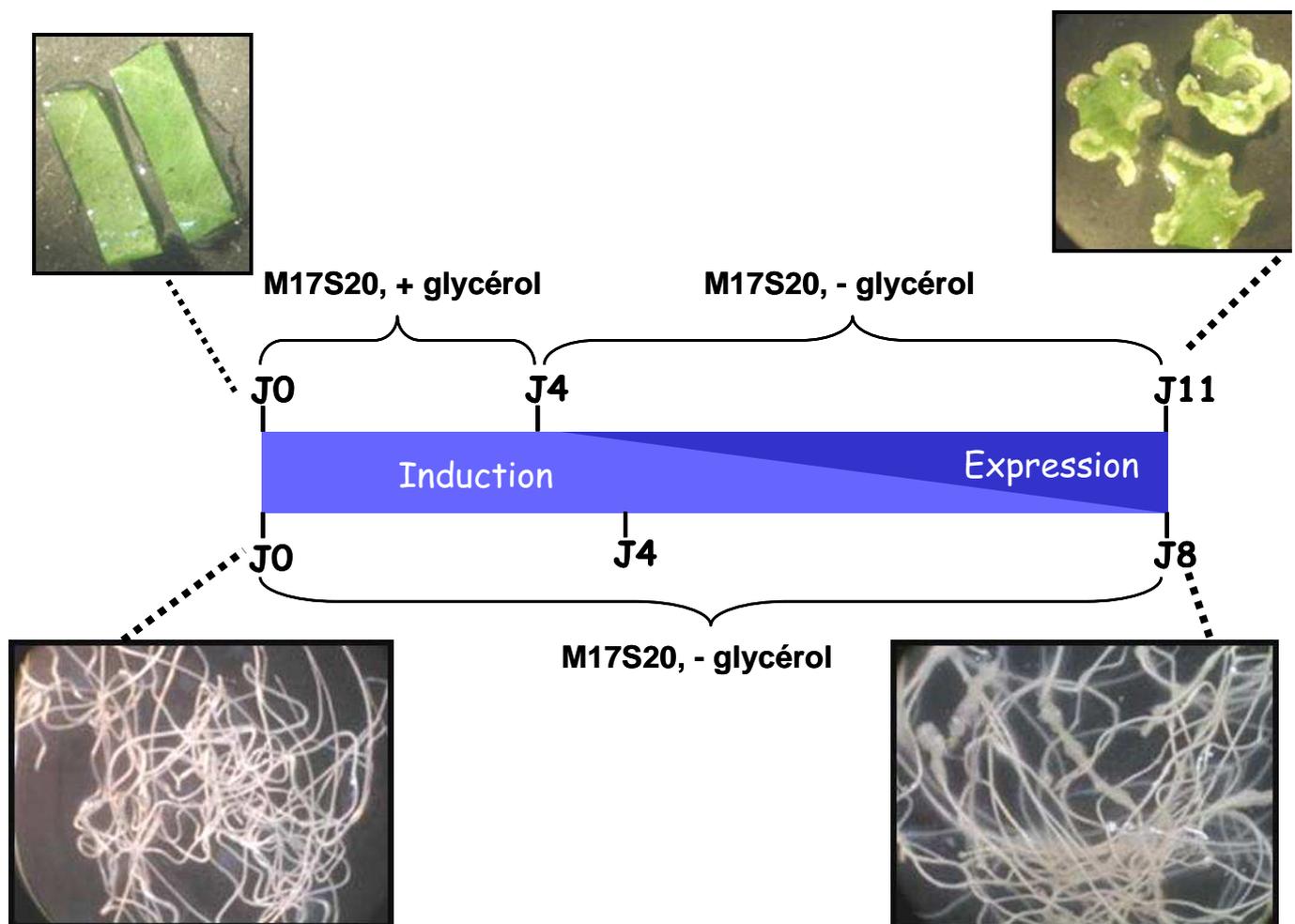


Figure 13: Schématisation de la mise en culture des feuilles et racines pour l'obtention d'embryons somatiques.

Les feuilles sont aseptisées par immersion dans du DOMESTOS 12 % (v/v) pendant 20 minutes puis rincées trois fois à l'eau osmosée stérile. Les feuilles

sont ensuite découpées en fragment de 75 mm² (15 mm sur 5 mm). Les fragments sont disposés dans des fioles, à raison de 6 fragments par fiole, contenant 20 ml de milieu M17S20 (avec ou sans glycérol). La culture s'effectue à l'obscurité et à 35°C pendant 8 à 11 jours selon l'organe.

Les milieux de culture et les fragments foliaires ou racinaires sont récupérés. Les milieux sont cumulés, en condition stérile, étant préalablement filtrés par des filtres de nitrate de cellulose de 0,45 microns (Millipore). Puis ils sont congelés et conservés à -80 °C puis concentrés par lyophilisation. Les fragments foliaires ou racinaires serviront à différentes analyses (figure 14).

2. Propagation clonale du matériel végétal

Pour la régénération de plantes, les fragments soumis à l'embryogenèse somatique sont prélevés après 8 à 11 jours de culture (J8 pour les racines et J11 pour les feuilles) pour les génotypes embryogènes. Les fragments sont alors transférés dans un milieu H5 liquide (annexe 2) (figure 14) et cultivés en chambre de culture avec une photopériode de 16 heures à 24°C/ 8 heures à 22°C (lumière/ obscurité) correspondant à une photopériode de jours longs (intensité lumineuse à 50 pmoles de photons.m⁻².s⁻¹) sous agitation. Puis les embryons sont transférés sur du H5 solide pour le développement des plantules. Pour les plantes non embryogènes, les hampes florales et les feuilles sont mises en culture en boîte de Pétri sur un milieu de bourgeonnement Bg 0,5 (annexe 3). Les bourgeons obtenus sont ensuite transférés sur le milieu H5 pour leur enracinement.

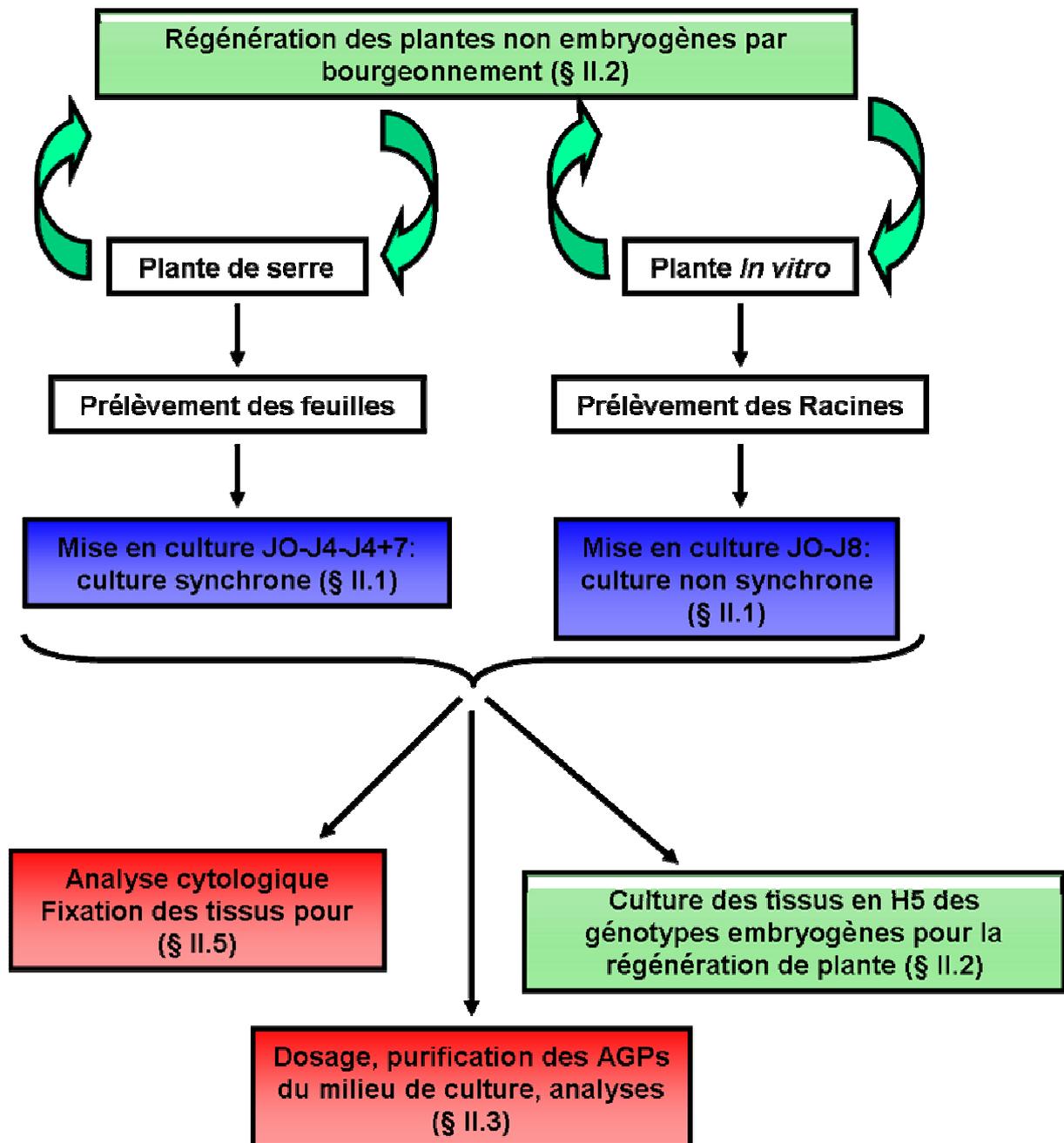


Figure 14: Représentation schématique de la régénération et de l'obtention du matériel biologique en vue d'analyses cytologiques et biochimiques.

3. Précipitation et dosage des AGPs.

Les AGPs peuvent être précipitées spécifiquement par le β -D-glucosyl Yariv Reagent (β -D-Glc-Y). Cette spécificité permet leur quantification et leur purification.

3.1. Préparation du β -D-glucosyl Yariv

La synthèse du 1,3,5-tris(4- β -D-Glucopyranosyloxyphenylazo)-2,4,6-trihydroxy- benzène (β -D-Glc-Y) s'effectue par le mélange de deux solutions A et B :

- Solution A: composée de 4 mmol de p-aminophenyl- β -D-Glucopyranosyl (Sigma) dissout dans 24 ml de HCl 0,5 M à 0°C et de 4 mmol de NaNO₂.
- Solution B: constituée de 1 mmol de phloroglucinol (sigma) dissout dans 50 ml d'eau ultrapure pH 9.
- La solution A est versée très lentement dans la solution B, en maintenant la température à 0°C et le pH à 9 par ajout de NaOH 0,5 N et 0,1 N. Le pH se stabilisera deux heures après l'ajout de la solution A.
- Le β -D-Glc-Yariv est précipité par addition de méthanol (v/v) puis centrifugé 15 min à 3 000g.
- Le surnageant est éliminé. Le culot est resuspendu dans de l'eau puis précipité de nouveau par le méthanol. Après centrifugation le culot est mis à sécher à 50°C
- Le β -D-Glc-Yariv est stocké en solution mère de 1 mg/ml dans une solution de NaCl 0,15 M et conservé à température ambiante.

3.2. Extraction et Purification des AGPs

- Les AGPs sont complexées par le β -D-Glc-Yariv une nuit à 4°C sous agitation par ajout d'une solution NaCl 0,15 M contenant du β -D-Glc-Y (1/1, m/m).
- Le complexe est centrifugé 15 min à 5 000 g, le culot est resuspendu dans du NaCl 0.15 M puis centrifugé dans les mêmes conditions.
- Les AGPs sont décomplexées par solubilisation du culot dans une solution de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ de concentration finale de 10% (m/v) à 50°C jusqu'à décoloration totale de la solution.
- Les AGPs sont ensuite dessalées par élution sur colonne PD-10 Sephadex G-25M (Pharmacia).

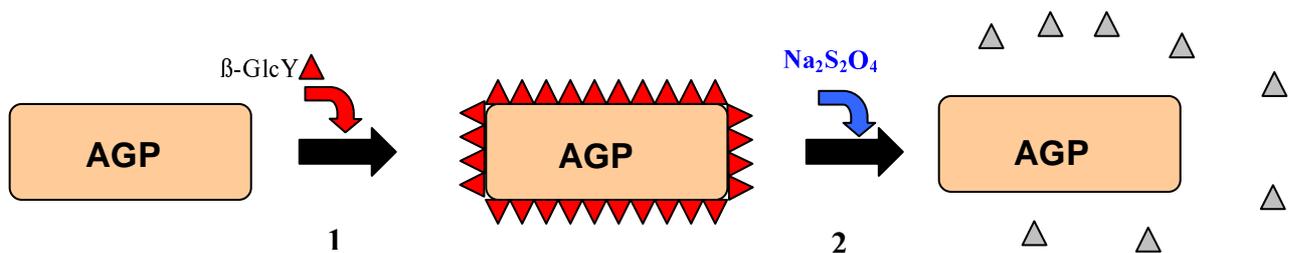


Figure 15: Schématisation de la méthode de purification des AGPs.

3.3. Dosage des AGPs

Les AGPs sont dosées par diffusion radiale en gel d'agarose 1% contenant du NaCl 0,15 M et 10 $\mu\text{g/ml}$ de β -D-Glc-Yariv (Van Holst *et al.*, 1985). Le gel est coulé dans des boîtes de culture (120 x 120 mm) à raison de 60 ml par boîte afin d'obtenir des gels d'environ 3 à 4 mm d'épaisseur. Les puits sont obtenus par l'emploi de plaques 96 puits souples, permettant ainsi d'obtenir des puits homogènes d'environ 4 mm de diamètre pouvant contenir 30 μl .

Les AGPs sont déposées à raison de 15 μl par puits. La diffusion s'effectue alors une nuit à l'obscurité en chambre humide. Les diamètres des halos colorés

sont mesurés. La correspondance en quantité d'AGPs s'effectue grâce à la diffusion simultanément, d'une gamme de gomme d'arabique (GA) (Sigma provenant de l'acacia) (0,05 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$: 15 μl /puits soit 0,75 ; 1,5 ; 2,25 et 3 μg) (figure 16A).

Les gels sont numérisés par le logiciel Agfa Fotolook 3.0 (350 ppi, 8 bits, échelle 100%). Les diamètres sont déterminés par le logiciel Photoshop 5.0 et sont exprimés en mm puis élevés au carré, permettant ainsi d'obtenir une corrélation entre la quantité d'AGPs et le diamètre du halo (figure 16B). L'équation de la droite permet de déterminer ainsi la quantité d'AGPs par rapport au diamètre obtenu (figure 16C).

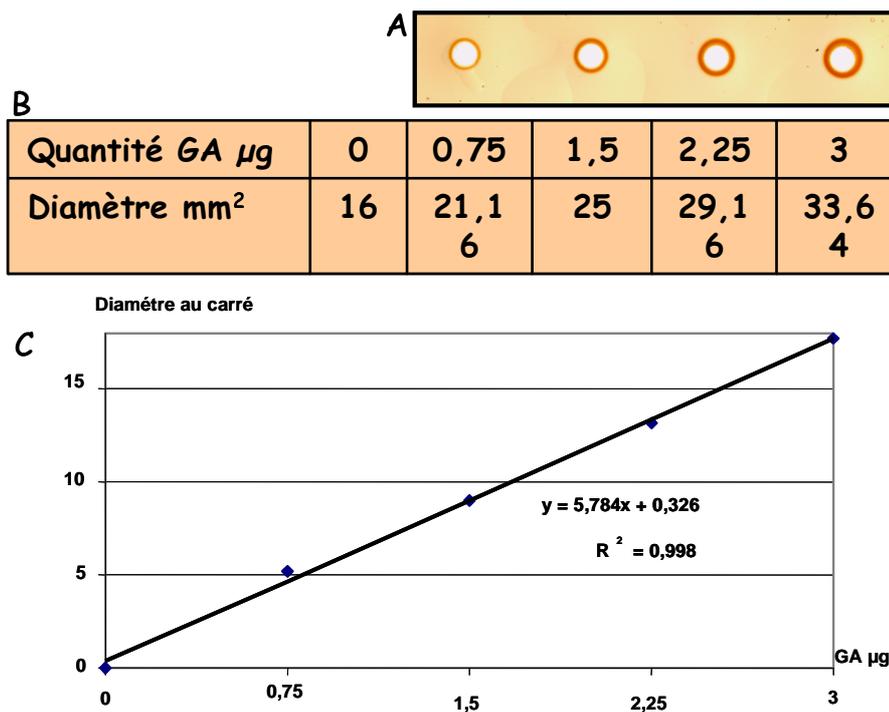


Figure 16: Dosage des AGPs par la méthode de gel à diffusion radiale. A : gamme de gomme arabique. B : correspondance de la quantité de gomme arabique et le diamètre du halo au carré. C : établissement de la droite de régression pour la détermination des concentrations.

4. Analyses des AGPs

4.1. Gel électrophorétique

Après purification et dosage, les AGPs sont reprises dans le tampon Laemli et séparées sur gel d'acrylamide-PDA (30%/0,8% ; Biorad) à 8% (gel 200 x 150 x 1 mm). La migration se fait à 50 V pendant 45 min puis à 300 V pendant 3h dans le tampon de migration SDS (384 mM glycine, 50 mM tris, 0,1% SDS p/v).

La mise en évidence des AGPs est réalisée grâce à trois colorations différentes : le nitrate d'argent, le réactif de Schiff et par le β -D-Glc Yariv. En effet, les AGPs sont très peu révélées par l'argent du fait de leur teneur pauvre en acides aminés et donc de liaison à l'argent. Ainsi nous utilisons d'autres colorations complémentaires comme le β -D-Glc Yariv et la méthode de Schiff pour mettre en évidence les AGPs.

La coloration à l'argent est basée sur la réduction ionique de l'argent (Blum *et al.*, 1987). A la fin de la migration, les gels sont placés dans une solution fixatrice (éthanol : 50%, acide acétique : 12%, formaldéhyde 37% : 0,1%) pendant deux heures. Après fixation des protéines, le gel est rincé trois fois dans l'éthanol 50% (v/v) pendant 20 min, puis plongé dans une solution de prétraitement (thiosulfate de sodium : 0,02%) pendant 1 min. Le gel est ensuite rincé trois fois à l'eau ultrapure pendant 20 secondes puis placé pendant 20 min dans une solution d'imprégnation du nitrate d'argent (nitrate d'argent:0,1%, formaldéhyde à 37%: solution finale à 0,05%). Après deux lavages rapides à l'eau ultrapure, les gels sont révélés avec une solution de révélation (thiosulfate de sodium : 0,004%, carbonate de sodium: 6%, formaldéhyde 37%: solution finale à 0,05%). La réaction est stoppée par remplacement de la solution de révélation par la solution fixatrice. Les gels sont ensuite stockés dans de l'éthanol 50%.

La coloration par la méthode de Schiff est réalisée par le kit GLYCOPROTEIN DETECTION (Sigma).

Les AGPs peuvent être aussi colorés par le β -D-Glc Yariv. Après migration, les gels sont directement plongés dans une solution de NaCl 0,15M contenant 0,2 mg/ml de β -D-Glc-Yariv (Gane *et al.*, 1995).

4.2. Séparation par HPLC

Les différentes AGPs sont séparées par HPLC sur colonne échangeuse d'anions permettant de séparer les AGPs selon leur charge. Nous utilisons une colonne MonoQ H5/ 5 (Pharmacia Biotech) constituée de silice et des polymères organiques chargés positivement ($\text{CH}_2\text{-N}^+(\text{CH}_3)_3$).

Après purification et dosage des AGPs issues des différents milieux de culture, un échantillon d'AGPs est injecté. L'élution des AGPs est réalisée par un gradient croissant de NaCl selon le protocole suivant :

Tableau 2: Programme d'élution des AGPs par HPLC. Débit : 0,7 ml/min. La lecture des mesures est réalisée à 215 nm (sensibilité 0,2 AUF).

Temps en min	0-5	5-10	10-20	20-25	25-35	35-40	40-50	50-60
% NaCl 1M	0	10	10	20	20	50	50	100
Tris-Hcl 20mM								
%Tris-Hcl 20mM	100	90	90	80	80	50	50	100
mode	isocratique	gradient	isocratique	gradient	isocratique	gradient	isocratique	gradient

4.3. Analyses des fractions

4.3.1. Composition en monosaccharides

La composition molaire en monosaccharides est déterminée par une analyse en phase gazeuse des produits de méthanolyse et de dérivations des AGPs sur une colonne Shimadzu (25 m x 0,32 mm CP-Sil5CB Low bleed/MS capillary column, 0,25 μm film phase Chrompack France, Les Ullis, France). La méthanolyse consiste en une libération quantitative de tous les monosaccharides (à l'exception des acides uroniques) par l'action de 500 μl de méthanol/HCl 0,5N pendant 24h à 80°C. La méthanolyse doit impérativement être réalisée en condition anhydre afin de ne pas entraîner de destruction des monosaccharides (formation d'anhydre-dérivés). Avant la méthanolyse 2 μg de lysine sont ajoutés afin de servir d'étalon pour quantifier les sucres. Les produits sont ensuite séchés sous N_2 .

L'analyse en phase gazeuse nécessite de rendre les produits volatils. Pour cela les monosaccharides sont dérivés par de l'heptafluorobutyrate anhydre (HFBA). Les sucres sont repris dans 200 μl de CH_3CN et 25 μl de HFB. La réaction se passe à 150°C pendant 10 min, puis les produits sont séchés de nouveau sous N_2 et resuspendus dans 100 μl de CH_3CN anhydre.

4.3.2. Composition en acides aminés

L'analyse de la composition en acides aminés est réalisée par hydrolyse et dérivation des AGPs selon la méthode de BIDLINGMEYER *et al.* (1984). Cette méthode consiste en une hydrolyse en présence de HCl 6N pendant 20 Heures à 110°C. Une hydrolyse plus douce par l'acide méthane-sulfonique est pratiquée, selon la méthode de COHEN *et al.* (1987), afin de déterminer la composition en tryptophane. La dérivation est réalisée avec le phénylthiocyanate : PITC.

Les hydrolysats dérivés sont analysés par HPLC (SPECTRA PHYSICS 8100) en phase inverse, à l'aide d'une colonne CHROMATEM C-18, 5 μm (4.6 x 250 mm) et en utilisant un gradient d'élution d'un solvant A à un solvant B, de 0 à 80% de B en 20 minutes à 1 ml.min⁻¹. Solvant A: acétate d'éthyle 0.1M. Solvant B: Acétonitrile 60% (v/v), Triéthylamine 0,065% (v/v), Acétonitrile 6% (v/v).

4.3.3. Western blot

Pour le western blot, les AGPs sont séparées sur gel d'acrylamide-PDA à 8% (même méthode que gel 1D). La migration se fait à 50 V pendant 45 min puis à 300 V pendant 3h dans le tampon de migration SDS.

Le transfert se réalise selon la méthode du sandwich dans le tampon d'équilibration à 4°C (glycine 192 mM, Tris 25 mM, méthanol 20%). Les AGPs sont transférées sur une membrane de nitrocellulose. Le transfert électrique se fait à 100 V pendant une heure et à 4°C. Après le transfert la membrane est saturée une nuit en agitation dans le tampon I (Tris 25 mM, NaCl 0,15 M, PVP 1%, pH 7,5).

Après saturation de la membrane, celle-ci est incubée 2h dans le tampon II (Tris 25 mM, NaCl 0,15 M, PVP 1%, Triton X100 0,2%, pH 7,5) en présence de l'anticorps primaire. Les anticorps primaires monoclonaux utilisés sont : MAC207, LM2 et JIM4, JIM8, JIM13, JIM14, JIM15 et JIM16 (IgG de rats) (Anticorps offert par J.P. Knox: PLANTPROBE, Leeds et par K. Roberts: JOHN INNES CENTRE, Norwich). Ils sont utilisés à une dilution au 1/30^{ème}.

Après incubation de la membrane avec l'anticorps primaire, la membrane est rincée trois fois 10 min dans le tampon II. Puis elle est incubée 2h dans le tampon II en présence de l'anticorps secondaire anti-IgG de rats (Alkaline Phosphatase-conjugated Anti-rat IgG, Roche) à une dilution de 1/500^{ème}.

La membrane est ensuite lavée trois fois avec le tampon II, puis la révélation des protéines est effectuée dans un tampon carbonate (NaHCO_3 0,1 M, MgCl_2 2 mM, pH 9,8) en présence de NBT/BCIP (1 $\mu\text{l}/\text{ml}$ de tampon carbonate, Roche).

5. Analyses cytologiques

Les fragments racinaires et foliaires sont collectés respectivement après 8 et 11 jours de culture et sont fixés dans le FAA (Formaldéhyde, Acide acétique et Alcool éthylique, 3.5/6.5/100 v/v/v) pendant au moins 3 jours à température ambiante. Ils seront ensuite directement colorés pour le comptage d'embryon ou alors inclus dans de la résine pour des analyses au niveau cellulaire.

5.1. Comptage des embryons somatiques

Les embryons somatiques issus des cultures embryogènes peuvent être dénombrés après coloration au Lugol (I_2 0,2 M, KI 0,8 M). Après immersion dans le colorant (quelques secondes), les fragments foliaires ou racinaires sont rincés avec de l'eau ultrapure, puis montés entre lame et lamelle. L'observation se fait sur un microscope photonique Olympus BH-2. Le nombre embryons est exprimé en nombre d'embryon/ mm^2 pour les fragments foliaires et en nombre d'embryon/mm linéaire pour les fragments racinaires.

5.2. Inclusion

Plusieurs types de résine sont disponibles selon le type d'analyse envisagé. Ainsi pour la préparation de « routine » permettant une analyse cytologique classique, la résine de type JB4 (Polysciences) sera préférée, par contre pour les coupes destinées à une immunolocalisation, l'inclusion sera réalisée dans une résine de type BMMC (Méthyl-Butyle Méthacrylate) (TAAB).

5.2.1. Inclusion en JB4 : analyse cytologie classique

Après fixation, les échantillons sont déshydratés par des bains successifs d'éthanol de force croissante (éthanol 30% à éthanol 100%, 2 x 30 min). Les échantillons sont ensuite imprégnés dans la résine.

Pour préparer cette résine, il est nécessaire de mélanger 100 ml d'une solution A (JB4-Embedding Solution A, Polysciences Inc.®), contenant du 2-HydroxyéthylMéthacrylate, à 1 g de catalyseur C (Benzoyl Peroxide Plasticized = catalyseur, Polysciences Inc.®).

Les fragments sont imprégnés de cette résine A+C pendant au moins 2h à 4°C (Selon l'explant, plusieurs jours peuvent être nécessaires, en changeant le bain deux fois par jour). Les tissus deviennent translucides et coulent au fond du tube. Après imprégnation par la résine, l'inclusion est réalisée avec une solution fraîche de A+C à laquelle est ajoutée 1/25^{ème} de solution B (JB-4 Embedding Solution B, Polysciences Inc.®), contenant du N,N-Diméthylaniline[[12]-69-7] Poly(éthylène oxide). Les fragments sont disposés dans des gélules (taille 2/ 6.0 mm diamètre/ 0.37 mL volume ; TAAB® Laboratories) ou moules (Leica) en présence de la solution A+C+B. Cette opération doit s'effectuer à 4°C pour empêcher la polymérisation de la résine. La polymérisation anaérobie dure environ 1h à 20°C (plus long au froid).

5.2.2. Inclusion en BMMC : analyse immunologique

La déshydratation des fragments nécessite une modification pour l'inclusion en résine BMMC et s'effectue comme suit :

- Rinçage dans du tampon de fixation (Piperazine-N,N'-Bis[2-ethanesulfonic acid] :Pipes 100 mM, pH 6,9) avec 1 mM de dithiothréitol: DTT

pendant une durée de	2 x 30 min
• Ethanol 50° + DTT 1 mM	30 min
• Ethanol 70° + DTT 1 mM	2 x 15 min
• Ethanol 95° + DTT 1 mM	2 x 30 min
• Ethanol 100° + DTT 1mM	2 x 1 h

L'imprégnation des échantillons est effectuée dans un premier temps avec une résine A composée de 4 volumes de Butyle méthacrylate pour 1 volume Méthyle méthacrylate 1V (+ DTT 10 mM), puis dans un deuxième temps dans une résine B (résine A + 0,5 de BEE : Benzoyl ethyl ether). Le BEE est un photo-activateur qui va favoriser la polymérisation de la résine lors de l'inclusion. L'imprégnation s'effectue sous la hotte et avec le port de gants. Le DTT est un antioxydant permettant de protéger et de conserver les épitopes.

Lors de l'imprégnation un bullage sous azote est nécessaire pour piéger l'oxygène dissous, car celui-ci est un inhibiteur de la polymérisation de cette résine. L'imprégnation et l'inclusion se déroulent selon le protocole suivant :

• Résine A + Ethanol 100° (V/3V)	30 min
• Résine A + Ethanol 100° (V/V)	2x60 min
• Résine A + Ethanol 100° (3V/V)	30 min
• Faire buller de l'azote dans la résine B	20 min
• Incuber dans la résine B	la nuit
• Incuber dans la résine B (neuve)	4h
• Incuber dans la résine B (neuve)	la nuit
• Incuber dans la résine B (neuve)	6 h

L'inclusion s'effectue dans des moules (Leica) remplis de résine B préalablement dégazée. Chaque échantillon est orienté en fonction du plan de coupe souhaité (transversal), tout en évitant le contact avec les parois du moule. Ceux-ci sont recouverts par un film plastique évitant ainsi l'évaporation de la résine méthyle/butyle méthacrylate lors de la polymérisation qui s'effectue sous UV à une longueur d'onde de 365 nm (à une distance de 28 à 32 cm de la source de lumière) à 4°C pendant 16h.

5.3. Réalisation et contrôle des coupes

Les lames destinées à recevoir les coupes pour l'immunolocalisation doivent subir obligatoirement un traitement préalable : la silanisation. Les lames sont placées en zigzag dans un portoir afin que la surface soit en contact maximal avec les différentes solutions pour réussir cette opération. De plus, grâce à cette disposition, le nombre de lames disposées dans la cuve en verre est augmenté permettant une économie des produits utilisés. Le travail s'effectue sous la hotte avec des gants.

Les lames sont placées 15 min dans un bain d'acide chlorhydrique 1M à température ambiante, sans agitation. Avec rinçage dans de l'eau ultrapure (2 x 5 min), on les place dans un bain d'éthanol à 95° pendant 5 min. Elles sont ensuite mises une minute dans une solution de silane (3[triéthoxysilyl]propylamine) (Merck) à 2 % dans de l'acétone. A nouveau, on effectue un rinçage dans de l'acétone (2x10 min) puis on termine par deux rinçages de dix minutes dans de l'eau ultrapure. Les lames sont ensuite séchées à l'air et conservées en boîte à température ambiante.

On réalise, tout d'abord, les couteaux de verre grâce au Knifemaker LKB 7800. Pour la réalisation des coupes, en résine BMMC uniquement, la gélatine des

gélules est ramollie après un bain de 10 min dans de l'eau bidistillée, puis éliminée. Les barres de verre, avec lesquelles sont réalisés les couteaux, sont de type ultra microtomy grade (TAAB). Les premières coupes effectuées sont épaisses de 3 μm . Une lame témoin est d'abord réalisée comportant 4 coupes ; celles-ci permet de visualiser les évènements intéressants présents ainsi que leur plan. Les coupes subissent une coloration au bleu de toluidine à 0,1% (M/V) dans de l'éthanol 50%.

L'observation s'effectue grâce à un microscope photonique Olympus® BH-2 muni d'un appareil photo Olympus® SC 35. Les pellicules photos utilisées sont des Elitechrome 100 ASA Kodak®.

5.4. L'immunolocalisation

Cette technique permet de localiser une protéine au sein d'un tissu, d'une cellule, à l'aide d'un anticorps dirigé contre cette protéine. L'immunolocalisation est réalisée sur des coupes préparées selon la méthode décrite dans le § 4.2.2. Les coupes sont ensuite saturées par incubation des lames dans un tampon phosphate (PBS: KH_2PO_4 100 mM, NaCl 138 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,4) contenant 0,05% de Tween 20 et 1% de sérum albuvine bovine (PBST) pendant 30 min. Puis les coupes sont incubées dans le tampon PBST en présence des anticorps anti-AGPs dilués au 1/5^{ème} pendant 1h à température ambiante. Les lames sont ensuite rincées trois fois avec le tampon PBS, puis incubées pendant 1h à température ambiante dans le tampon PBS en présence de l'anticorps secondaire (anti-rat IgG) (Jakson Immunoresearch, Lab. Inc., USA) à une dilution de 1/100^{ème}. Les coupes sont alors lavées par le tampon PBS et par de l'eau ultrapure.

La révélation s'effectue grâce à la fluorescéine iso thiocyanate (FITC) qui est couplée à l'anticorps secondaire et qui produit une fluorescence verte sous les UV.

6. Prétraitement des plantes

Le prétraitement consiste en l'immersion des feuilles ou des racines durant 2 jours dans une solution contenant de la spermine 0,5 mM, du glycérol 330 mM et de l'acide abscissique (ABA) 50 μ M (Moreews *et al.*, 2005). Ce prétraitement permet l'augmentation de la capacité embryogène des génotypes embryogènes et des génotypes faiblement embryogènes.

7. Modifications des conditions et des milieux de culture

7.1. Culture en présence de β -D-Glc Yariv

Les feuilles et les racines, des différents génotypes embryogènes et non embryogènes, sont mises en culture dans le milieu de culture M17S20 additionné de 250 μ M de β -D-Glc Yariv (Chapman *et al.*, 2000c).

7.2. Culture en présence de monosaccharides et de proline

Les fragments foliaires ou racinaires de génotypes embryogènes sont mis en culture dans le milieu de culture M17S20 supplémenté en monosaccharide et/ou en proline (L-proline, Sigma). Les monosaccharides testés sont : la glucosamine : GlcNH₂ ; le galactosamine : GalNH₂ ; le N-acetyl-galactosamine : GalNAc ; le N-acetyl-glucosamine : GlcNAc (Sigma).

Une première étude porte sur l'addition de proline, d'un mélange de monosaccharides ou de l'addition de proline et de monosaccharides, à raison de 0,2 μ g/ml de milieu de culture pour la proline et associés à un mélange de monosaccharides où chacun d'eux est ajouté à raison de 0,01; 0,1; 0,2; 2 et 4 μ g/ml. Une seconde étude porte sur l'addition, dans le milieu de culture, de proline (toujours à 0,2 μ g/ml de milieu de culture) combinée avec un seul monosaccharide (concentration de 0,2 μ g/ml ou 1 μ g/ml).

7.3. Culture en présence d'inhibiteur de la phospholipase C

7.3.1. Culture en présence de néomycine

La néomycine (inhibiteur de la phospholipase C et D) est ajoutée à différentes concentrations dans le milieu de culture M17S20 d'un génotype embryogène. Les concentrations utilisées sont de 25, 100 et 200 μM . La néomycine est ajoutée toutes les 48h à partir du jour 0 (pour des raisons de demi-vie de la molécule, Baggot *et al.*, 1981). La solution de néomycine est filtrée à l'aide de filtres stériles de 0,2 μm (Minisart, Sartorius) pour travailler en condition aseptique. Le système racinaire d'une plantule *in vitro* âgée de 6 semaines est sectionné en 2. La moitié est cultivée en condition témoin, l'autre est mise en culture en présence de l'inhibiteur.

7.3.2. Culture en présence de l'U73122

L'U73122 (Sigma) est une molécule inhibitrice spécifique de la phospholipase C, alors que l'U73343 (Sigma) est considérée comme une molécule analogue inactive. Ces molécules sont insolubles dans l'eau, mais solubles dans l'éthanol ou dans le DMSO. Dans notre cas, ces molécules seront solubilisées dans l'éthanol à raison de 5 mg/8 ml d'éthanol. Les solutions sont filtrées à l'aide de filtres stériles de 0,2 μm (Minisart, Sartorius) pour travailler en condition aseptique. Les molécules seront ajoutées dès le premier jour de culture et un apport sera effectué toutes les 48h. Plusieurs concentrations sont testées : 1 ; 2,5 et 5 μM . Comme précédemment, le système racinaire d'une plantule est divisé en 2 parties, l'une est utilisée comme culture témoin et l'autre pour la culture en présence de l'inhibiteur.

8. Extraction de membrane plasmique et action de la phospholipase C

Les membranes plasmiques sont extraites selon la méthode décrite par Larsson *et al.* (1987). Cent dix grammes de feuilles *in vivo* sont mixées dans 275 ml d'une solution de HEPES/KOH 50 mM pH 7,5 contenant 0,5 M de saccharose, 5 mM d'acide ascorbique, 1 mM DTT et 0,6% PVP (m/v). Le mélange est filtré puis centrifugé à 10 000g pendant 10 min à 4°C pour éliminer les chloroplastes et mitochondries. Le surnageant est centrifugé à 100 000g pendant 30 min à 4°C. Le culot est ensuite resuspendu dans 10 ml d'une solution composée de 0,33M de saccharose, 3 mM KCl, 5 mM phosphate de potassium à pH 7,8. Neuf grammes de cette solution sont ajoutés à 27g d'une solution donnant une composition finale de 6,2% (m/m) Dextran T500 (Amersham), 6,2% (m/m) polyéthylène glycol 3350, 0,33 M de saccharose, 3 mM KCl, 5 mM de phosphate de potassium pH7,8. L'échantillon est mélangé par inversion du tube, puis centrifugé à 1500g pendant 5 min à 4°C. La phase inférieure contenant les membranes plasmiques est centrifugée à 100 000g pendant 30 min à 4°C.

Les membranes plasmiques sont resuspendues dans une solution de HEPES/NaOH 10 mM pH 7.4 (Droillard *et al.*, 1993), et incubées pendant 3h à 30°C avec une phospholipase C spécifique : *Bacillus cereus* PI-PLC (Sigma-Aldrich) à une concentration finale de 10 unités/mL. Après l'incubation, les échantillons sont dessalés sur colonne PD10 (Amersham).

9. Mise en évidence de l'ancre GPI

La mise en évidence de l'ancre GPI est réalisée en deux étapes, méthanolyse puis dérivation par l'anhydre heptafluorobutyrique (HFBA) des monosaccharides et après hydrolyse acide des acides aminés (Pons *et al.*, 2003).

Les monosaccharides et acides aminés ainsi dérivés sont analysés en GC/MS. La présence de l'ancre GPI se caractérise par la présence d'éthanolamine après méthanolyse des AGPs et la présence d'inositol et de glucosamine lors de l'hydrolyse acide.

Cent microgrammes d'AGPs sont lyophilisés puis soumis à une méthanolyse par ajout de 1 ml de méthanol anhydre et de 0,5M HCl pendant 20h à 80°C. Cette étape permet la libération d'unités de monosaccharides sans dégradation de la partie protéique. Après séchage sous azote, l'échantillon est dérivé par addition de 200 µl d'acétonitrile et de 50 µl d'HFBA et chauffé à 150°C pendant 30 min. Puis les réactifs sont évaporés par un flux d'azote et repris par 200µl d'acétonitrile dont 2 µl sont injectés pour l'analyse GC/MS des monosaccharides dérivés.

Le reste de l'échantillon est séché sous azote puis soumis à une hydrolyse acide classique par ajout de 100 µl d'HCl à 6 M pendant 20 h à 100°C. Cette étape permet la coupure des liaisons peptidiques. Après évaporation sous azote, une courte méthanolyse est réalisée par addition de 500 µl de méthanol anhydre et de 0,5 M HCl pendant 1 h 30 à 80°C pour former des esters. Puis après séchage sous azote, l'échantillon est trans-estérifié par ajout de 200 µl d'alcool isomamylique HCl 1,5 M à 100°C durant une nuit. Les acides aminés sont, après séchage sous azote et air chaud, alors dérivés par addition de 200 µl d'acétonitrile et de 25 µl HFBA pendant 30 min à 150°C. Après évaporation, 400 µl d'acétonitrile sont ajoutés et 1 µl est injecté pour une analyse GC/MS.

Lors de l'analyse GC/MS, la séparation est effectuée sur un système chromatographique Carlo Erba GC 8000 équipé d'une colonne CP-Sil5 CB Low bleed/MS de 25 m x 0,32 mm, phase de film de 0,25 µm (Chrompack France, Les Ullis, France). La température de l'injecteur « Ross » est de 260°C et les

échantillons sont analysés en utilisant un programme de température débutant à 90°C pendant 3 min suivi par une augmentation de celle-ci de 5°C/min jusqu'à une température de 260°C.

La colonne GC est couplée à un spectromètre de masse Finnigan Automass II (détection limite 1 000 Da). L'analyse est réalisée en mode d'impact de l'électron (énergie d'ionisation 70 eV, température de la source 150°C). La quantification des différents constituants est réalisée en mode TIC (total ion count) du détecteur et du logiciel Xcalibur (Finnigan).



RÉSULTATS

The background of the slide features four purple flowers on green stems, set against a light, slightly blurred background. The flowers are arranged in a roughly circular pattern, with one in the top left, one in the top right, one in the bottom left, and one in the bottom right. The text is centered over the middle of the image.

1^{ère} PARTIE
MISE EN ÉVIDENCE D'AGPs
AU COURS DE
L'EMBRYOGENESE SOMATIQUE

I. Etude des AGPs chez l'hybride interspécifique « 474 » (*C. intybus* x *C. endivia*)

Etude donnant lieu à l'écriture d'un article qui sera soumis à *Plant Physiology and Biochemistry*.

Introduction

Des études réalisées sur le *Cichorium* hybride « 474 » ont permis de mettre en évidence plusieurs composés dont les teneurs augmentent durant l'embryogenèse somatique. Ainsi il a déjà été constaté que les teneurs endogènes en certaines polyamines croissent durant la phase de développement des embryons somatiques et que l'ajout de l'une d'entre elles, la spermine, dans le milieu de culture augmente le nombre d'embryons somatiques (Deldique & al, 1995). De même, des dosages d'acide abscissique (ABA) ont montré des teneurs plus importante chez les génotypes embryogène par rapport aux génotypes non embryogène. Par ailleurs, l'ABA peut jouer un rôle dans l'induction de l'embryogenèse somatique comme chez *Hevea brasiliensis* (Veisseire & al, 1994 ; Cailloux & al, 1996). A partir de ces observations, il a été entrepris de réaliser des prétraitements des différents organes avant la mise en culture embryogène, dans le but d'augmenter la capacité de production d'embryons somatiques des génotypes embryogènes et de tenter de lever la récalcitrance des génotypes qualifiés jusqu'alors de non embryogènes. La capacité embryogène a ainsi pu être augmentée par un traitement des feuilles et racines pendant 2 jours dans une solution contenant de la spermine 0,5 mM, du glycérol 330 mM et de l'acide abscissique (ABA) 50 μ M (Moreews, DEA 1998).

L'implication des AGPs a été mise en évidence par l'utilisation du β -D-Glc Yariv au cours de l'embryogenèse somatique (Chapman & al, 2000c), grâce, aux prétraitements nous avons voulu vérifier si l'augmentation de l'embryogenèse

somatique par ces prétraitements permet aussi de modifier la quantité d'AGPs libérées dans le milieu de culture. Afin de mieux comprendre le rôle des AGPs au cours de l'embryogenèse somatique chez la chicorée, nous avons essayé d'isoler et de caractériser une ou plusieurs classes d'AGPs impliquées dans l'embryogenèse somatique.

Running title: Role of AGPs in pretreatment for somatic embryogenesis

Effects of explant pretreatments on somatic embryogenesis in embryogenic and recalcitrant *Cichorium* cultivars. II. Involvement of AGPs

WINDELS David¹, DEMILLY Magali^{1,2}, BLERVACQ Anne-Sophie^{1*},
COUILLEROT Jean-Paul¹, CAPON Calliope³, MICHALSKI Jean Claude³, HILBERT Jean-
Louis¹.

1 Laboratoire de Physiologie de la Différenciation Végétale, UPRES –EA 3569
/ERT1016/IFR118, Université des Sciences et Technologies de Lille, Bâtiment SN2, 59655
Villeneuve d’Ascq Cedex, France

2 present address : Laboratoire DRDC/BBSI (UMR 5092 CEA-CNRS) CEA
Grenoble, 17, rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 09, France.

3 Laboratoire de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR 8576, Université
des Sciences et Technologies de Lille, Bâtiment C9, 59655 Villeneuve d’Ascq Cedex, France

Author for correspondence * E-mail: blervacq@univ-lille1.fr

Tel: 00-33/ (0)3 20 40 16

Fax: 00-33/ (0)3 20 33 71 77

Abstract

Somatic embryogenesis (SE) is characterized by a well-defined developmental pattern which is induced by multiple inductible factors. In the Chicory interspecific hybrid “474” (*Cichorium intybus* L. var. *sativum* x *Cichorium endivia* L. var. *latifolia*), SE could be greatly improved by a pretreatment of leaves or roots for 2 days in a solution combining spermine/ abscissic acid / glycerol (SAG pretreatment). Arabinogalactan proteins (AGP) were quantified in the culture medium as they were previously characterised as a major factor for SE (i.e. obtention of multicelled-embryo). Their chromatographic profiles were also compared. Immunolocalisation, with different antibodies, permit to show that JIM16 recognized specific embryos structure. Quantities of extracellular AGPs seemed to be correlated to SE potential comparing the somatic embryos produced in treated versus untreated explants, in the low-embryogenic genotype *C. intybus* cv. Pévèle and the non-embryogenic genotype *C. intybus* cv. Flash. Independently of the pretreatment of tissues, the conditioning of culture medium was also investigated. Addition of sugars, combined or not with proline, modified the expression of SE in the high embryogenic hybrid. The effects of these factors were dependent to the organ explant tested (root, leaf). The relationships between the release of AGPs, the improvement of SE through the addition exogenous factors or pretreatment, are discussed.

Keyword: Arabinogalactan Proteins, *Cichorium*, conditioned medium, polyamine, somatic embryogenesis, sugars.

Abbreviations: SE: Somatic embryogenesis, AGP: Arabinogalactan protein; RC: reactivated cell, SAG: spermine, abscissic acid and glycerol ; GPI: GlycosylPhosphatidyl Inositol anchor.

1. Introduction.

Arabinogalactan proteins (AGPs) are a family of proteoglycans that are widely distributed throughout the plant kingdom, in different organs as leaves, roots, floral parts and seeds [21] and mainly at cell surfaces, several localizations of AGPs have been demonstrated at the subcellular level mainly in plasma-membrane and cell wall [24]. This family of plant molecules is known as the Hydroxyproline-rich glycoproteins family (HRGPs), and includes the extensins, AGPs, Pro/Hyp-rich glycoproteins and the solanaceous lectins [30]. AGPs protein backbone was used to classify them into two groups “classical” and “non-classical” based on amino acids domains. Genes for classical AGPs encode proteins with an N-terminal secretion signal, a central domain rich in Pro/Hyp and a C-terminal hydrophobic domain involved in the attachment of the glycosylphosphatidylinositol-anchor (GPI-anchor) [28]. AGPs have the specificity to bind to and precipitated with the β -glucosyl Yariv [36]. Their carbohydrate moiety (more than 90%) is typically rich in arabinose (L-arabinofuranose) and galactose (D-galactopyranose) organized generally as a type II arabino-3-6-galactan [24]. The protein backbone accounts for a minor part (1 to 10%) and, characteristically, alanine, serine, threonine and hydroproline/proline residues, account for 80% of all the amino acids present [24].

AGPs have multiple functions in various aspects of plant growth and development [21]. They are considered as ubiquitous and are implicated in cell elongation, pollen tube growth as well as in fertilization, and vascular tissue differentiation. They are assumed to be soluble signal molecules and contribute with cell wall polysaccharides to a complex network which controls cell metabolism and development [26]. AGPs are essential in somatic embryogenesis of carrot [20]. Different fractions of AGPs have been isolated and have promotive or inhibitory effects on carrot somatic embryogenesis [32]. Furthermore, AGPs may be a substrate for endochitinases. So AGPs are constituted of N-acetylglucosamine and Glucosamine and chitinase treatment enhances the embryo-promoting activity of AGPs [33]. If their implications in cell differentiation or cell proliferation processes are described, their biochemical and/or physiological roles are not precisely determined. Yet, recently AGPs have been implicated in transmembrane and cell-cell signaling pathways in a variety of plants [29]. This author reviewed putative involvement of AGPs in cellular signalling and cell adhesion.

In previously study, we have established that precipitation of extracellular AGPs with Yariv during the culture could inhibit totally somatic embryogenesis process (induction and expression) in chicory [8]. Moreover, in this plant AGPs epitopes were specifically localized in the first differentiating tissue of the embryo: the protoderm [9]. AGPs could play a role in the dedifferentiation-redifferentiation pathway. According to previous results where somatic embryogenesis could be induced or modified by different pre-treatments [23]. Here we investigated the somatic embryogenesis potential of chicory in relation to the release of extracellular AGPs in the culture media. These glycoproteins were characterized in different organs submitted or not to somatic embryogenesis induction. According to the results of these first biochemical analyses, we have modified the culture medium for increasing the somatic embryogenesis competence.

2. Results and discussion.

2.1. Somatic embryogenesis can be modified after SAG pretreatment.

Leaf and root organs of different genotypes were submitted to somatic embryogenesis directly or after SAG pretreatment. As shown in table I, without pretreatment the interspecific hybrid '474' was particularly embryogenic as compared to cv. Pévèle which was poorly embryogenic, and cv. Flash which was non-embryogenic. Nevertheless, when pretreated, somatic embryogenesis was increased in '474' and the cv. Pévèle was able to form small embryoïd structures which will further develop as well-defined in vitro plantlets. Nothing was observed in cv. Flash after pretreatment (data not shown).

So, the pretreatment defined in [23] was efficient to suppress recalcitrance of some cultivars, but it had no effect with the cv. Flash that is absolutely unable to produce any formations as callus, shoot or embryoïds under the culture conditions applied. Student's statistic test confirmed that the increase of the embryo number in '474' and cv. Pévèle by pretreatment was significant except for cv. Pévèle leaves.

Sensitivity to pretreatment seemed to depend on the morphogenetic capacity of genotypes. In our case, we used the highly embryogenic '474' (hybrid), the poorly embryogenic genotype cv. Pévèle (*C. intybus*) and the non-embryogenic genotype cv.'Flash' (*C. .intybus* var *foliosum*). SE competence seems to depend on the variety among the *C. intybus* cultivars, and even if somatic embryos could be induced, the number of embryos was lower than when using the intergenic hybrid '474'. SE genetic control is probably a complex

character, depending also on the *in vitro* culture conditions. We have previously discussed the fact that polyamines supplementation to the culture medium led to differential results on improving SE in Chicory [23]. Different cultivars showed different sensitivities to the same polyamine pretreatment [35]. Evidence gathered recently suggests that polyamines are implicated in the regulation of cell proliferation and differentiation [5]. They also accumulate in response to diverse stresses, and it was proposed that osmotica, such as mannitol, sorbitol, sucrose or proline induced an increase of putrescine biosynthesis [12]. Moreover, the regulation of the arginine decarboxylase biosynthesis could be post-translational regulated by spermine under stress conditions [6]. In rape, it has been suggested that the flux of S-adenosyl methionine either in ethylene or polyamine pathways were extremely responsive to environmental changes [2]. In Chicory, we have previously investigated polyamines metabolism and ethylene interactions during SE induction and expression [14]. We propose that the differences in the ability to produce somatic embryos between the three genotypes tested could be related to changes in the production of polyamines and/or ethylene.

Table I: Number of somatic embryos and quantity of AGPs obtained when different organs and genotypes were submitted to SAG pretreatment (NT: no treated; T: treated) during 11 days. The number of somatic embryos was determined per mm⁻¹ for root (in a linear way) and per mm⁻² of leaf blade. Embryos were counted after lugol staining as described by Moreews et al. (this issue). Quantity of AGPs was determined by single gel radial diffusion. Student statistic test was applied per genotype and per organ between each conditions NT and T. Significant differences values were labeled with * (n=10; $\alpha < 0,05$).

Genotype	Organ	Treatment	Number of embryos	Quantity of AGPs $\mu\text{g.mL}^{-1}$ culture medium
474	Roots	NT	1.44 \pm 1.48*	10.69 \pm 0.85*
		T	2.14 \pm 1.55*	11.69 \pm 0.01*
	leaves	NT	4.3 \pm 3.68*	5.70 \pm 0.05*
		T	6.37 \pm 6.60*	4.27 \pm 0.27*
Pévèle	Roots	NT	0.006 \pm 0.045*	1.77 \pm 0.83
		T	0.032 \pm 0.095*	2.37 \pm 0.83
	leaves	NT	0.01 \pm 0.04	0.80 \pm 0.40
		T	0.03 \pm 0.1	0.91 \pm 0.37
Flash	Roots	NT	0	1.96 \pm 0.42
		T	0	1.68 \pm 1.01
	leaves	NT	0	0.79 \pm 0.06*
		T	0	0.16 \pm 0.01*

2.2. The effects of pretreatment on AGPs are secreted in cultures medium of root and leaf explants.

To investigate whether there exists a correlation between the presence of AGPs in the culture media and the embryogenic competence, the quantity of AGPs was estimated with the single radial diffusion method.

AGPs quantities in the medium were five-fold higher for the interspecific hybrid “474” compared to the *C. intybus* cultivars, whatever the explant origin (*table I*). Only, cv. Pévèle was able to form small embryos at D11 in standard conditions. Concerning organs, root seemed to produce 2 to 3 fold more AGPs than leaves. Though the quantity of AGPs released in the culture medium is higher when the number of embryos is higher. Nevertheless for “474” leaves, AGPs release was higher when organs were not pretreated. There seems to be no direct correlation between the two entities. It may be that the amount of AGPs released has to reach a certain level in order to trigger somatic embryogenesis.

The relative high amount of AGPs observed in root culture medium could be related to the disorganization of root tissue which occurred during cultivation. Cortical parenchyma became completely disorganized and some cells were only loosely attached. Under these conditions, the release of AGPs originally associated with cells wall is greatly facilitated.

To our knowledge, a comparison between secreted AGPs of different organs cultivated in the same conditions and expressing the same morphogenetic pathway has not been published. It was assumed that the sets of AGPs were organ-dependent, but in our case, we expected to select common AGPs putatively linked to SE process, independently from the organs cultivated.

The regulation of AGP expression is quite complex and even though we previously demonstrated that the addition of β 1.3 D-Glc Yariv reagent to the culture medium inhibited totally SE induction and expression in hybrid ‘474’ [8], the effects observed here seemed to be more linked to qualitative aspect of the glycoproteins than to the quantitative aspect. Hormone-responsive genes have also to be considered. The hypothesis that AGPs gene expression is related to cellular processes (cell reactivation, elongation) and to phytohormones was supported by [25], who suggested that both events, AGPs and hormone effects, cooperate during the morphogenetic response. Data are available describing the regulation of AGP gene by hormones. *LeAGP-1* mRNA expression from *Lycopersicon esculentum* is upregulated by cytokinins while auxins and ABA inhibited it [31]. Water deficit was showed to induce the

expression many stress-responsive genes in lower or higher plants. Some of these gene are inducible by ABA and encode LEA (late embryogenic abundant) proteins [22,1], or to protective enzymes and proteins [17]. One could expect the nucleic sequence of the promoter of AGP-encoding genes could give some indication concerning their regulation in pretreated and non-pretreated genotypes correlated with SE competence.

2.3. Somatic embryos exhibit characteristic AGP epitopes during precocious phase of induction and development.

To confirm the implication of AGP during precocious steps of SE, immunolocalization was performed using different JIM and MAC/LM antibodies. Most of anti-AGPs antibodies gave no significant results regarding cell identity or cell commitment to SE. Plasma membrane of all cells, *i.e.* mesophyll, induced or reactivated cells, embryonary cells, were labeled but no differences were noticed related to the intensity.

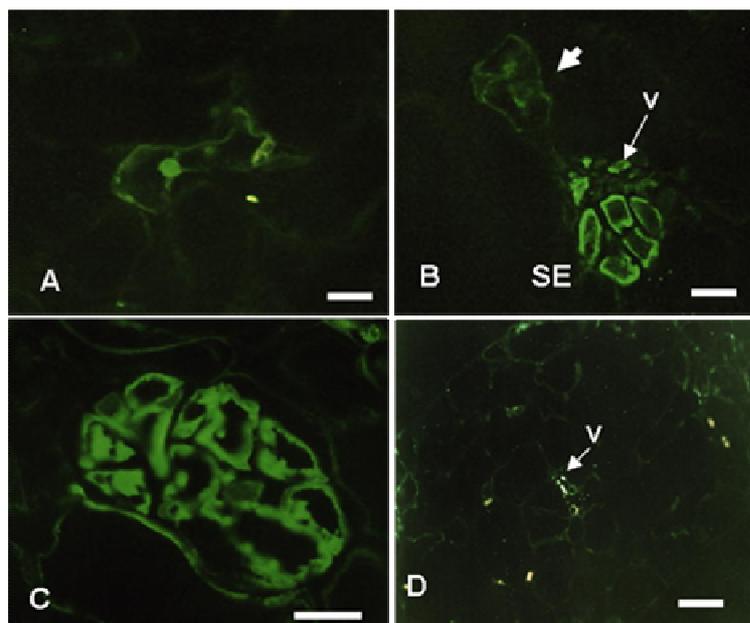


Figure 1: Immunolocalisation of JIM16 epitope AGPs in leaves of Chicories (at D11). A-C: Embryogenic hybrid '474'. A: membrane of reactivated mesophyll cell exhibiting a central nucleus maintained by cytoplasmic trabeculae. Cytoplasm surrounding nucleus is particularly labelled. B: Embryogenesis occurred frequently near minor vein (v). Reactivated cells showed faint signal (head of arrow), young somatic embryos showed bright fluorescence in the cytoplasm near the cell wall. JIM16 epitopes were also observed in phloem

tube. C: Older globular somatic embryo. Some granules, similar to multivesicular bodies were observed in the vacuole (arrow head). D: non embryogenic cultivar Flash. No event of mitosis occurred. Mesophyll cells had no specific labelling. Along the plasmalemma, some chloroplasts were faintly stained. v: minor vein. Bar scales = 20 μ m except C, bar = 10 μ m.

Only JIM16 antibody labelling gave us selective results. Few scattered signals were detected in the leaf blade at D0. When competent cells received the induction signal and re-entered the cell cycle (reactivated cell status, *figure 1A*), they showed signals in the

cytoplasm, on the nucleus surface and in the trabecules maintaining the nucleus in the cell center. After the segmentation phase, which was characterized by small embryogenic cells confined to the original cell volume, somatic embryos exhibited labeling on their plasma membranes (*figure 1B, 1C*). Some globules were also stained in the cytoplasm or associated with the vacuome. In Flash genotype (*figure 1D*) no labeling can be observed.

Little information is available concerning the biosynthesis and turnover of AGPs within the cell. Few investigations led us to understand how AGPs are included in the cell wall or in the plasma membrane, and how they are secreted in the culture media. Some authors suggested that there is a rapid turnover of AGPs while cell wall AGPs radioactivity quickly declined, AGPs or their degradation product appeared to reenter the cells rather than be secreted into the culture medium [13]. During the precocious phase of reactivation, we noticed a high proportion of cytoplasmic AGPs while secreted AGPs were accumulated in the medium during SE induction and expression phases [8]. Presence of granules in the vacuome of reactivated cell and multicellular embryos might represent multivesicular bodies, as were previously observed in tobacco leaves [16]. The authors [16] proposed that the multivesicular bodies represent transport vehicules in the internalization and disposal of cell surface material. This could result in a transient exposure of a specific AGP-related glycan structure at the reactivated cell or embryo cell surface as part of a signaling pathway. Recently, it was established that some of them exhibited a GlycosylPhosphatidyl Inositol anchor [28]. As AGPs complexation with β -D-Glc Yariv at plasma membrane level greatly affected SE [8], cell surface AGPs could be involved in cell division and the disruption of AGP interaction with cell surface components.

In chicory, no set of mesophyll cells were specifically immunolabeled at D0, in contrast in carrot embryogenic cell suspensions, embryogenic clusters exhibited JIM 8 and JIM4 epitopes [27]. Curiously, JIM16 epitope, as well as MAC207, were assigned to all carrot root apex cells, while JIM4, JIM13 and JIM15 epitopes were linked to specific set of cells related to the formation of concentric and radial pattern of tissues during root development [18].

2.4. Analysis of extracellular AGPs.

Extracellular AGPs were isolated from culture media using β -D Glc Yariv complexation, and HPLC profiles of AGPs obtained from the medium of leaf or root explants cultures from was done according to the hybrid '474' and cv Pévèle were compared.

Eight fractions were collected after elution. In order to verify the AGPs identity of each fraction, an analysis of monosaccharides, amino acids compounds and single radial diffusion was performed (data not show). No major differences were observed either considering the genotype or the organs (*figure 2*). The surface proportions of the eight fractions isolated from the root hybrid '474' culture medium in standard condition or after pre-treatment of plantlets were showed in *figure 3*. No significative differences could be used to link AGPs to the SE competence. Even if the number of somatic embryos could be increased *via* pretreatment, no specific changes in the quantitative accumulation of AGPs was seen. In this way, we concluded that if a highly embryogenic genotype produced a high amount of AGPs, no particular AGPs fractions seemed to be related to SE competence as well.

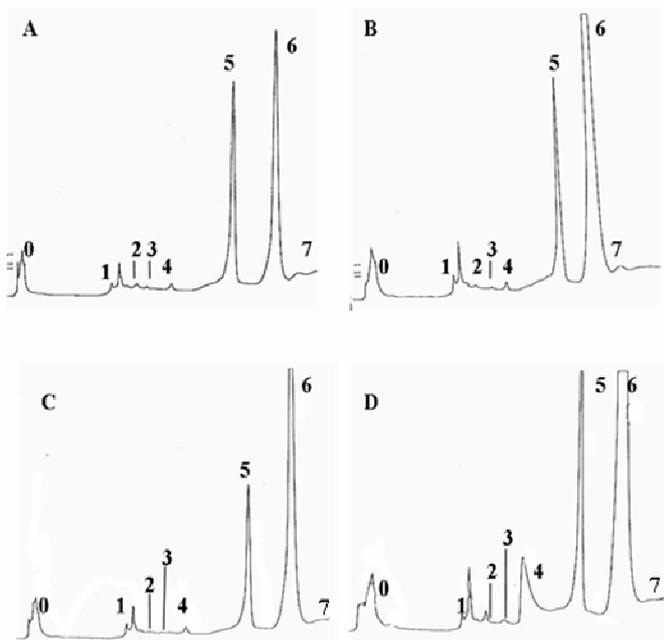


Figure 2: HPLC profiles of extracellular AGPs isolated from culture medium of organs and genotypes (at D11). A: root of the interspecific hybrid 474. B: leaf of 474. C: root of *C.intybus* cv. Pévèle D: leaf of cv. Pévèle. Eight fractions (T0, T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7 respectively) were further determined.

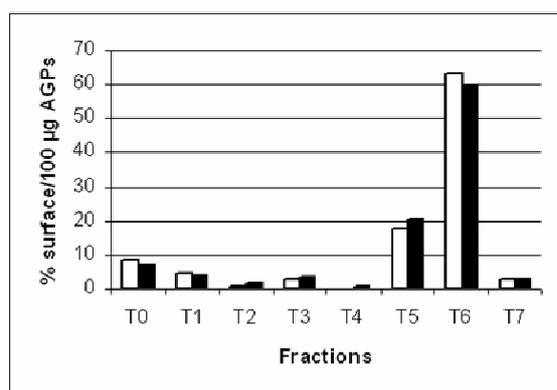


Figure 3: Representation of the various HPLC fractions according to their proportion of the profile surface. Fractions of '474' root SAG pretreated (white box) and in '474' root no SAG pretreated (black box) were compared. Percentage represents the proportion of each fraction (in the HPLC profile) compared to total surface.

Numerous HPLC columns and solvent conditions were applied to improve separation of these eight fractions. The results (not shown) indicated that each of the eight fractions contained at least 2 to 4 subfractions. This could be explained by AGPs differing in their protein core and/or in their degree of glycosylation (maturation) or of their degradation. We hypothesized that release AGPs in the medium could be under a spatio-temporal regulation. Such a regulation has been already described for oligogalacturonides production during carrot SE [3]. However so far we were not able to separate those subfractions, and thus to determine a specific AGPs.

2.5. Effects of proline and sugars supplementation on somatic embryogenesis competence.

According to the composition of AGPs described in the literature [21, 24], we performed experiments based on additives supplementation during *in vitro* culture. As we observed above, pretreatment of plantlets before SE culture significantly increased the number of somatic embryos. But, whereas AGPs were necessary for the induction and the development of embryos [8], no quantitative or qualitative fractions were yet isolated. Consequently, we focused our attention on other triggering signals as additives which could be involved in the synthesis of AGPs. The choice was established on proline and N-acetyl sugars. All these components were expected to stimulated SE.

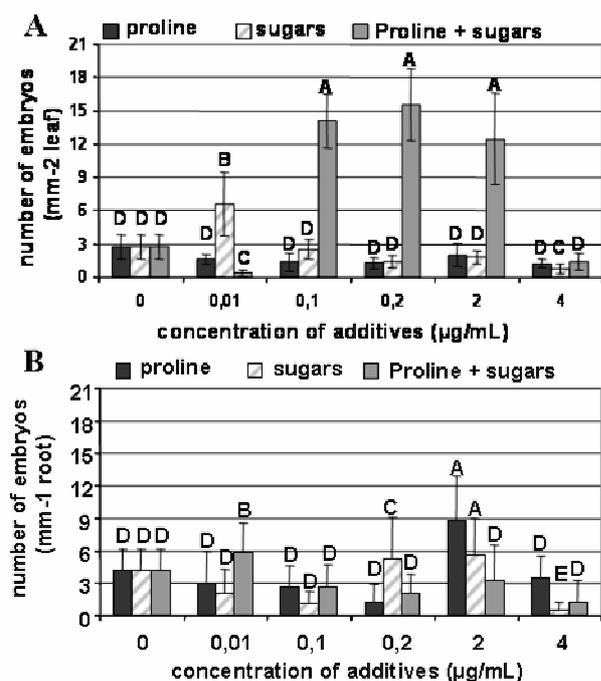


Figure 4: Comparison of the somatic embryogenesis potential of the hybrid '474' submitted to a culture in presence of proline, a mix of sugars, or proline + mixed of sugars (D11). Concentrations of additives were related to those of Proline added alone or combined with sugars. Concerning the mixed of sugars, the concentration is related to those of each simple sugar used for the mixed. A: Somatic embryos were counted by mm⁻² of leaf explant. B: Somatic embryos were counted mm⁻¹ of root explant. Results of Student Newman and Keuls range test are shown where means followed by different letters are significantly different at the 5% probability level.

In leaves explants of the hybrid '474', a complementation with proline or mixed sugars (*figure 4 A*), did not increase SE, and was quite harmful to describe. When proline was added alone, SE was not increased. Condition consisting of mixed sugars gave us an increase of embryos numbers only for the concentration of 0.01 $\mu\text{g/mL}$, others had negative effects. Main effect on SE was obtained for 0.1 to 2 $\mu\text{g/mL}$, with an optimum at 0.2 $\mu\text{g/mL}$ when proline was combined with mixed sugars. This condition produced 5 fold more embryos than under standard conditions. A positive interaction was thus noticed between proline and mixed sugars for leaf explants.

In root of the hybrid (*figure 4 B*), the influence of different conditions was more complex. Statistical Neuma-Keuls test established that 13 on 24 culture conditions gave not significant effect. The optimal condition was the addition of 2 $\mu\text{g/mL}$ proline added alone or 2 $\mu\text{g/mL}$ of mixed sugars. A significant effect was observed with the combination of 0.01 $\mu\text{g/mL}$ proline with 0.01 $\mu\text{g/mL}$ of each sugars constituting the mixed sugars solution. The interaction between proline and mixed sugars gave not a similar increase of the number of embryos as it was observed for leaf explants. This high concentrations of proline or mixed sugars seemed to improve SE if they are added alone.

Proline accumulation in plant is often associated with osmotic adjustment. Strong relationships were also noticed in leaves with the changes in putrescine and polyamine contents [12]. During SE in chicory culture of leaf explants, the first step of culture is achieved in the presence of 330 mM of glycerol (induction phase). Then leaves were transferred to a new medium deprived of glycerol (expression phase). In this aspect, there was an osmotic stress which could affect or modify proline or polyamines metabolisms as it was already established in Chicory SE [14]. Moreover, we noticed an organ-dependent effect according morphogenetic response induced with additive supplementations. Explants from Leaves and roots were not sensitive to the same concentration and conditions applied.

3. Conclusions.

In this study, we have shown that it is possible to modify SE induction and expression in embryogenic hybrid and in the poorly embryogenic *intybus* cv. Pévèle after pretreatment, or by supplementation with proline and a mix of sugars. No reactivating cytological shape was observed in *C. intybus* recalcitrant cv Flash. The pretreatment is thus not universal, but depends on the genotype and the cultivars. If the release of high amounts of

AGPs is a characteristic of the highly embryogenic genotype, nevertheless the number of embryos produced is not directly correlated with the quantity of AGPs released in the culture medium.

4. Methods.

4.1. Plant material and culture conditions.

Plantlets of the *Cichorium* hybrid '474' (*Cichorium intybus* L. var. *sativum* x *Cichorium endivia* L. var. *latifolia*) were propagated by direct somatic embryogenesis from root [11]. The growth conditions were 12 h light, 24C°/ 12 h dark, 20C°, photoperiod with a photon flux rate of 50 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

For comparison with recalcitrant genotypes, akenes of *C. intybus* cv. Pévèle and *C. intybus* cv. Flash (*C. intybus* var. *foliosum* cv. Flash) were placed for germination on Heller medium [15] supplemented with 15 mM sucrose and 6 g.L^{-1} agar. After 3 days, young plantlets were transferred to tubes containing Heller medium then placed under the same growth conditions as described above.

4.2. Induction and expression of somatic embryogenesis.

Roots of 2-months-old plantlets were cut and placed in standard induction medium as describe previously [4]. Induction of roots was achieved after 11 days at 35°C in darkness in agitated liquid medium. For leaves, 6 leaf fragments of 6-weeks-old plantlets were cultured for 4 days at 35°C in darkness in 20 mL of induction medium supplemented with 330 mM glycerol (induction step). Leaf fragments were then transferred for 7 days in the same medium devoided of glycerol (expression step). Roots and leaves were collected after 11 days of culture (at D11).

4.3. SAG Pretreatment of root and leaf.

To increase their competence to somatic embryogenesis, root and leaf explant were pretreated as described in [23]. Briefly, this consisted to incubate roots and leaves of the whole plantlet during two days in spermine 0.5 mM, ABA 50 μM and glycerol 330 mM solution (SAG pretreatment). Leaves and roots were then cut from the plantlet for experiments.

4.4. Infiltration with JB4 resin.

At D11, root and leaf fragments were fixed in a FAE formaldehyde/acetic acid/ethanol solution (3.6 / 6.5 / 90, v/v/v), dehydrated through a range of increasing concentrations of ethanol and infiltrated with JB4 wax (Polysciences). Sections of 3 μm were cut on a Leica RM 2065 microtome and stained with toluidine blue (0.5 % w/v in aqueous solution). The number of embryogenic cells and embryos were counted.

4.5. Immunolocalisation of AGPs.

At D11, leaf fragments were fixed and dehydrated as described previously and infiltrated with n-Butyl-Methyl-Methacrylate resin (TAAB). Thin sections (3 μm) were blocked with 0.05 % v/v Tween 20 in phosphate buffered saline (PBS: 100 mM K-phosphate, 138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.4) containing 0.1% w/v BSA (PBST) for 30 min. Sections were incubated with 1:5 dilutions (in PBST buffer) of AGP monoclonal antibodies, gift from Dr J.P Knox (Univ. Leeds, U.K.) and Pr K. Roberts (John Innes Institute, Norwich, U.K.), at room temperature for 1 h and rinsed three times with PBS buffer before incubating with a 1:100 dilution (in PBS buffer) of goat anti-rat IgG-fluorescein isothiocyanate-(FITC)-conjugated secondary antibodies (Jackson Immunoresearch Lab., Baltimore, Md., USA) for 1 h at room temperature. After extensive washing in PBS and water, sections were examined under an Olympus BH-2 fluorescence microscope.

4.6. Precipitation of AGPs.

Extracellular AGPs were isolated from the culture medium with β 1.3 D-GlcYariv reagent as described in [19]. They were quantified by single radial diffusion as described in [34]. AGPs were conserved in water at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.7. HPLC.

AGPs were submitted to an anion exchange column (MonoQ H5 / 5 Pharmacia Biotech). They were eluted with a discontinuous gradient (0 to 100% solvent B: NaCl 1 M and Tris-HCl 20 mM; solvent A: water and Tris-HCl 20 mM; flow rate $0.7\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) and different fractions were collected. Chromatography was monitored by absorption at 215 nm.

4.8. Monosaccharides and amino acids compounds.

Monosaccharides compositions of AGPs were determined by gas chromatography (GC) on a Shimadzu gas chromatograph equipped with a 25 m x 0.32 mm CP-Sil5CB Low bleed/MS capillary column, 0.25 μm film phase (Chrompack France, Les Ullis, France) after methanolysis (0.5 M HCl-methanol for 24 h at 80°C), N-reacetylation and trimethylsilylation. Amino acids composition was determined after hydrolysis [7], and derivation of AGPs (Method Pico.Tag®; WATERS) as described in [10]. Amino acids were analyzed by HPLC (SPECTRA PHYSICS 8100) with a column CHROMATEM C-18, 5 μm (4,6 x 250 mm) and were eluted with a gradient of 0 at 80% of B during 20 min (1 mL.min⁻¹; solvent A: 0.1 M Methyl acetate, 0.065% v/v triethylamine, 6% v/v acetonitrile; solvent B: 60% v/v acetonitrile).

4.9. Culture of '474' hybrid with proline and a mix of sugars.

To affect somatic embryogenesis, three supplementation conditions were tested: (a) proline was added (Sigma), (b) different sugars were used at a same concentration to constitute a mix solution. These sugars were: galactosamine, glucosamine, N-acetyl galactosamine, N-acetyl glucosamine, N-acetyl neuraminic acid (all from Sigma), (c) Proline combined with the mixed sugars were added to the medium. In this case, Proline and each molecule of the mix were used at the same concentration. Concentration of each component, even in (b), was comprised between 0.01 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ to 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of culture medium. For each conditions (a), (b) or (c), the number of somatic embryos was determined as described in [23]

Aknowledgments

This work was supported by a “Contrat Plan Etat-Région” and a doctoral fellowship from the “Ministère de la Recherche” to D. Windels. Technical works were performed by C. Masquelier for in vitro culture and by C. Roelstraete for immuno-localisation. The authors thanked C. Brassart for amino acids analysis and S. Alvarez for her help in statistical analysis. Prof. Théo Hendriks (USTL) is thanked for critical reading of the manuscript and valuable discussions.

References

- [1] Arati P., Krishnaprasad B.T., Ganeshkumar M., Savitha M., Gopalakrishna R., Ramamohan G., Udayakumar M., Expression of an ABA-responsive 21 KDa protein in finger millet (*Eleusine coracana* Gaertn.) under stress and its relevance in stress tolerance, *Plant. Sci.* 164 (2003) 25-34.
- [2] Aziz A., Martin-Tanguy J., Larher F., Plasticity of polyamine metabolism associated with high osmotic stress in rape leaf discs and with ethylene treatment, *Plant. Growth. Regul.* 21 (1997) 153-163.
- [3] Baldan B., Bertoldo A., Navazio L., Mariani P., Oligogalacturonide-induced changes in the developmental pattern of *Daucus carota* L. somatic embryos, *Plant. Sci.* 165 (2003) 337-348.
- [4] Bellettre A., Couillerot J.P., Blervacq A.S., Aubert, S., Gout E., Hilbert J., Vasseur J., Glycerol effects both carbohydrate metabolism and cytoskeletal rearrangements during the induction of somatic embryogenesis in chicory leaf tissues, *Plant. Physiol. Biochem.* 39 (2001) 503-511.
- [5] Bouchereau A., Aziz A., Larher F., Martin-Tanguy J., Polyamines and environmental challenges: recent development, *Plant Sci.* 140 (1999) 103-125.
- [6] Borrell A., Besford R.T., Altabella T., Masgrau C., Tiburcio A.F., Regulation of arginine decarboxylase by spermine in osmoically-stressed oat leaves, *Physiol. Plant.* 98 (1996) 105-110.
- [7] Bildlingmeyer B.A, Cohen S.A., Tarvin T.L., Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization, *J. Chromatogr.* 336 (1984) 93-104.
- [8] Chapman A., Blervacq A.S., Vasseur J., Hilbert J.L., Arabinogalactan-proteins in *Cichorium* somatic embryogenesis: effect of beta-glucosyl Yariv reagent and epitope localisation during embryo development, *Planta.* 211 (2000a) 305-314.
- [9] Chapman A., Helleboid S., Blervacq A.S., Vasseur J., Hilbert J.L., Removal of the fibrillar network surrounding *Cichorium* somatic embryos using cytoskeleton inhibitors: analysis of proteic components, *Plant. Sci.* 150 (2000b) 103-114.
- [10] Cohen S.A., Bidlingmeyer B.A, Tarvin T.L, *Proteins: structure and function*, J.J.l'italien Eds., Plenum Press, New York, (1987) pp207-213.
- [11] Dubois T., Guedira M., Dubois J., Vasseur J., Direct somatic embryogenesis in leaves of *Cichorium*, *Protoplasma.* 162 (1991) 120-127.

- [12] Flores H.E., Galston A.W., Osmotic stress-induced polyamine accumulation in cereal leaves. I. Physiological parameters of the response, *Plant Physiol.* 75 (1984) 102-109.
- [13] Gibeaut D.M., Carpita N.C., Tracing cell wall biogenesis in intact cells and plants. Selective turnover and alteration of soluble and cell wall polysaccharides in grasses. *Plant Physiol.* 97 (1991) 551-561.
- [14] Helleboid S., Couillerot J.P., Hilbert J.L., Vasseur J., Inhibition of direct embryogenesis by β -difluoremethylarginine in a *Cichorium* hybrid: effects on polyamine content and protein patterns. *Planta* 196 (1995) 571-576.
- [15] Heller R., Recherche sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés *in vitro*. *Ann Sci. Bot. Veg.* 14 (1953) 1-223.
- [16] Herman E.M., Lamb C.J., Arabinogalactan-rich glycoproteins are localized on the cell surface and in intravacuolar multivesicular bodies. *Plant Physiol.* 98 (1992) 264-272.
- [17] Ingram J., Bartels D., The molecular basis of dehydration tolerance in plants, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47 (1996) 377-403.
- [18] Knox J.P., Arabinogalactan-proteins: developmentally regulated proteoglycans of plant cell surface. In: membranes: specialized functions in plant, Bios Smallwood M., Knox J.P., Bowles D.J. Eds., Scientific publisher, Oxford, 6 (1996) 93-102.
- [19] Kreuger M., van Holst G.J., Arabinogalactan proteins are essential in somatic embryogenesis of *Daucus carota* L., *Planta*. 189 (1993) 243-248.
- [20] Kreuger M., van Holst G.J., Arabinogalactan-protein epitopes in somatic embryogenesis of *Daucus carota* L., *Planta*. 197 (1995) 135-141.
- [21] Majewska-Sawka A., Nothnagel E.A., The multiple roles of arabinogalactan proteins in plant development, *Plant Physiol.* 122 (2000) 3-9.
- [22] Mayabi N., Beckett R.P., Csintalan Z., Tuba Z., ABA increases the desiccation tolerance of photosynthesis in the afro-montane understory moss *Atrichum androgynum*, *Ann. Bot.* 88 (2001) 1093-1100.
- [23] Moreews et al., 2004, in this issue
- [24] Nothnagel E.A., Proteoglycans and related components in plant cells, *Int. Rev. Cytol.* 174 (1997) 195-291.
- [25] Park M.H., Suzuki Y., Chono M., Knox J.P., Yamaguchi I., *CsAGPI*, a gibberellin-responsive gene from Cucumber hypocotyls, encodes a classical arabinogalactan protein and is involved in stem elongation, *Plant Physiol.* 131 (2003) 1450-1459.
- [26] Pennell R.I., Cell walls: structures and signals, *Curr. Opin. Plant Biol.* 1 (1998) 504-510.

- [27] Pennell R.I., Janniche, L., Scofield G.N., Booij H., de Vries S.C., Roberts K., Identification of a transitional cell state in the developmental pathway to carrot somatic embryogenesis, *J. Cell. Biol.* 119 (1992) 1371-1380.
- [28] Schultz C., Gilson P., Oxley D., Youl J., Bacic A. GPI-anchors on arabinogalactan-proteins: implications for signaling in plants, *Trends in Plant Science.* 3 (1998) 426-431.
- [29] Showalter A.M. Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function, *Cell. Mol. Life. Sci.* 58 (2001) 1399-1417.
- [30] Sommer-knudsen J., Bacic A., Clarke A. E. Hydroxyproline-rich plant glycoproteins, *Phytochemistry.* 47 (1998) 483-497.
- [31] Sun W., Kieliszewski M.J., Showalter A.M. Overexpression of tomato LeAGP-1 arabinogalactan-protein promotes lateral branching and hampers reproductive development, *Plant J.* 40 (2004) 870-881.
- [32] Toonen M.A.J., Schmidt E.D.L., Van Kammen A., de Vries S.C., Promotive and inhibitory effects of diverse arabinogalactan proteins on *Daucus carota* L. somatic embryogenesis, *Planta.* 203 (1997) 188-195.
- [33] Van Hengel A. J., Tadesse Z., Immerzeel P., Schols H., Van Kammen A., de Vries S.C., N-acetylglucosamine and glucosamine-containing arabinogalactan proteins control somatic embryogenesis, *Plant Physiol.* 125 (2001) 1880-1890.
- [34] Van Holst G. J., Clarke A. E., Quantification of arabinogalactan-protein in plant extracts by single radial gel diffusion, *Anal. Biochem.* 148 (1985) 446-450.
- [35] Yadav J.S., Rajam M.V., Temporal regulation of somatic embryogenesis by adjusting cellular polyamine content in eggplant, *Plant Physiol.* 116 (1998) 617-625.
- [36] Yariv J., Rapport M.M., Graf L., The interaction of glucosides and saccharides with antibody to the corresponding phenylazoglycosides, *Biochem. J.* 85 (1962) 383-388.

II. Etude des AGPs chez les individus Koospol (*C. intybus*)

Suite au changement de matériel végétal (voir § I. Matériel), nous avons voulu vérifier si les résultats obtenus sur l'hybride « 474 » pouvaient être généralisés aux nouveaux génotypes utilisés au laboratoire.

Les AGPs issues de la culture de feuilles du génotype K59 ont été précipitées par le β -D-Glc Yariv puis séparées par électrophorèse sur gel d'acrylamide à 8%. Les AGPs ont été détectées par trois méthodes différentes permettant de mettre en évidence les protéines, les AGPs et les glycoprotéines. Après coloration au réactif de Schiff et au β -D-Glc Yariv, les profils électrophorétiques (figure 17) montrent un smear homogène, dans la partie haute du gel, correspondant aux AGPs. De plus nous pouvons observer, par la coloration au nitrate d'argent et au réactif de Schiff, la spécificité de la précipitation des AGPs par le β -D-Glc Yariv, ce qui permet une purification très spécifique de ces molécules. Le smear est composé d'AGPs de grande taille puisque celui-ci est supérieur au marqueur de taille de 120 KDa. L'obtention d'un smear est due à la nature même des AGPs pauvres en acides aminés et très riche en monosaccharides. Ainsi, il est très difficile de visualiser et d'identifier des bandes de taille différente et donc des classes d'AGPs différentes. Cependant, on peut noter que le smear obtenu se situe dans la même zone de taille que pour l'hybride « 474 » (Chapman & al, 2000).

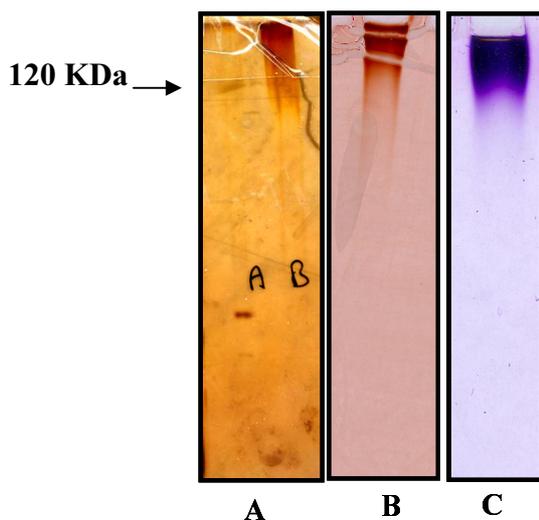


Figure 17 : Profil électrophorétique des AGPs issus du milieu de culture de feuille de K59. A : coloration à l'argent. B : coloration au β -D-Glc Yariv. C : coloration par le réactif de Schiff. Dépôt de 40 μ g par puits.

Nous avons analysé par HPLC les profils d'AGPs issues du milieu de culture foliaires de génotypes K59 et K28 après onze jours. Sur la base des temps de rétention obtenus, les profils HPLC (figure 18) de K59 et K28 montrent une nette similitude entre ces deux génotypes comme dans le cas entre l'hybride « 474 » et Pévèle.

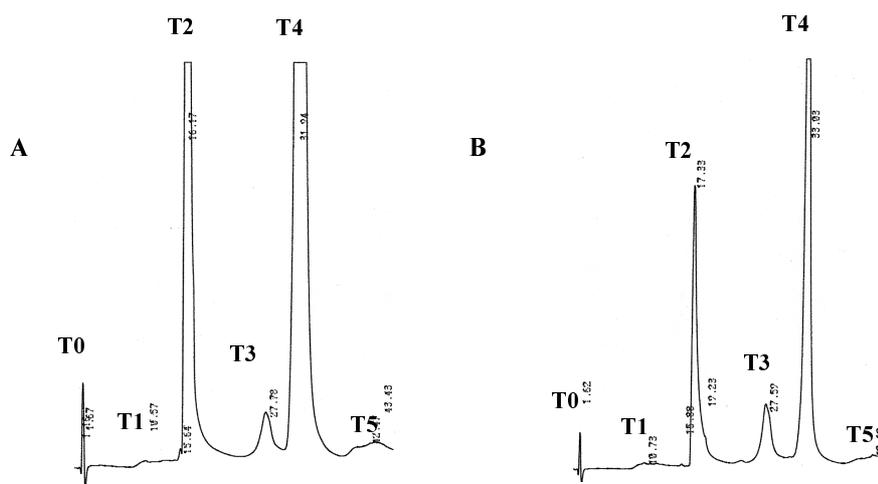


Figure 18 : Profils HPLC des AGPs libérées dans le milieu de culture. Colonne MonoQ H5 / 5 (Pharmacia Biotech). A : profil HPLC du génotype K28 (104 μ g injecté). B : profil HPLC du génotype K59 (104 μ g injecté).

Cependant nous pouvons observer que les profils des individus K59 et K28 ne sont pas significativement différents de ceux obtenus pour l'hybride 474 (cf I 1^{ère} partie). Les profils de K59 et K28 montrent quelques fractions en moins par rapport à 474, Toutefois, les pics majeurs trouvés chez K59 se retrouvent chez l'hybride 474 (Tableau 3). Ainsi, si le temps de rétention des pics nous laisse penser que les AGPs concernées ne sont pas différentes quant à leur charge, on note des différences concernant la surface de ces pics. Le pic T5 de K59, ici, très minoritaire, correspond au pic T6 chez 474 qui est là, très majoritaire.

Tableau 3: Comparaison des fractions AGPs entre 474 et K59 issus de la séparation par HPLC des AGPs.

Temps de rétention	1,5 min	16 min	26 min	33 min	42 min
474	T0	T1	T4	T5	T6
K59	T0	T2	T3	T4	T5

Ainsi dans le cas de l'hybride « 474 » et pour les génotypes Koospol, l'analyse des profils HPLC des AGPs libérées dans le milieu de culture lors de l'ES ne nous permet pas de mettre en évidence une ou plusieurs fractions spécifiques de l'ES. De plus les faibles rendements obtenus après séparation par HPLC ne nous permettent pas de pouvoir analyser toutes les fractions de façon à déterminer une composition en sucres et en acides aminés. Pour les fractions analysées (figure 19), celles-ci confirment leur appartenance à la famille des AGPs par :

- Une richesse en sucre de type : galactose et arabinose.
- Une richesse en hydroxyproline/proline, alanine, sérine et thréonine.

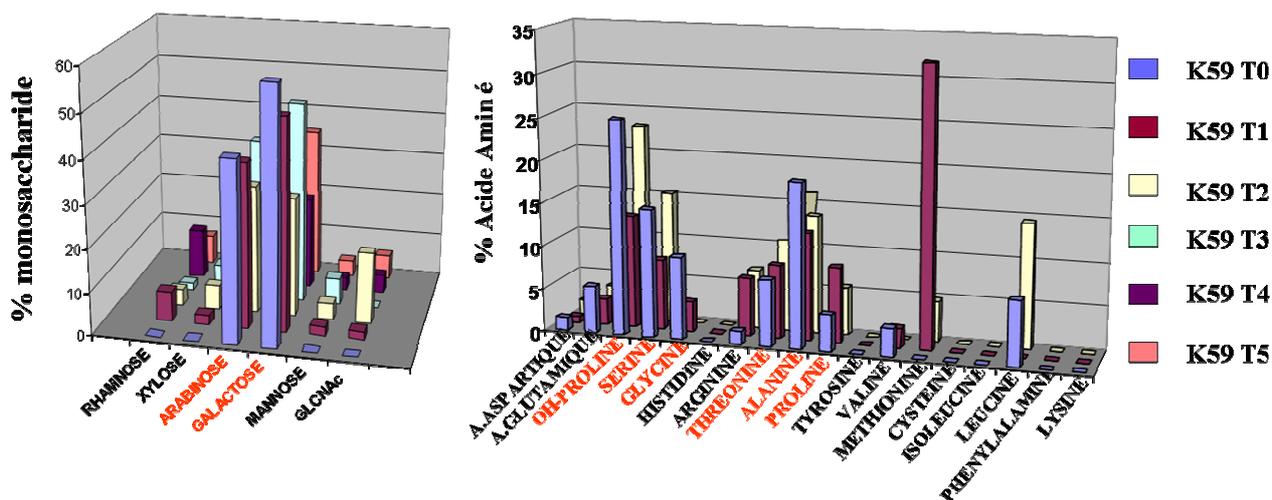


Figure 19 : Composition en monosaccharides et en acides aminés des différentes fractions d'AGPs du génotype K59.

Afin de préciser, si la composition des AGPs peut avoir un rôle au cours de l'embryogenèse, comme chez la carotte où la libération de glucosamine et de N-acetylglucosamine permet une restauration de l'embryogenèse somatique à partir de protoplastes non embryogène (Van Hengel et al, 2001), nous avons modifié le milieu de culture par addition de différents sucres et d'acides aminés. La supplémentation en sucre et/ou en proline dans le milieu de culture pour les feuilles et racines de K59 a été réalisée dans les mêmes concentrations que pour l'hybride « 474 ». Les résultats obtenus (figure 20) montrent des effets différents entre les racines et les feuilles.

Pour les feuilles, l'effet est très net. En effet, on peut observer une augmentation du nombre d'embryons après l'addition simultanée de proline et des monosaccharides aux concentrations de 0,1 ; 1 et 2 $\mu\text{g/ml}$. A l'inverse, l'addition de proline et des monosaccharides seuls ne provoque aucun effet sur la production d'embryons somatiques, hormis pour l'addition de proline seule à la concentration de 0,01 $\mu\text{g/ml}$.

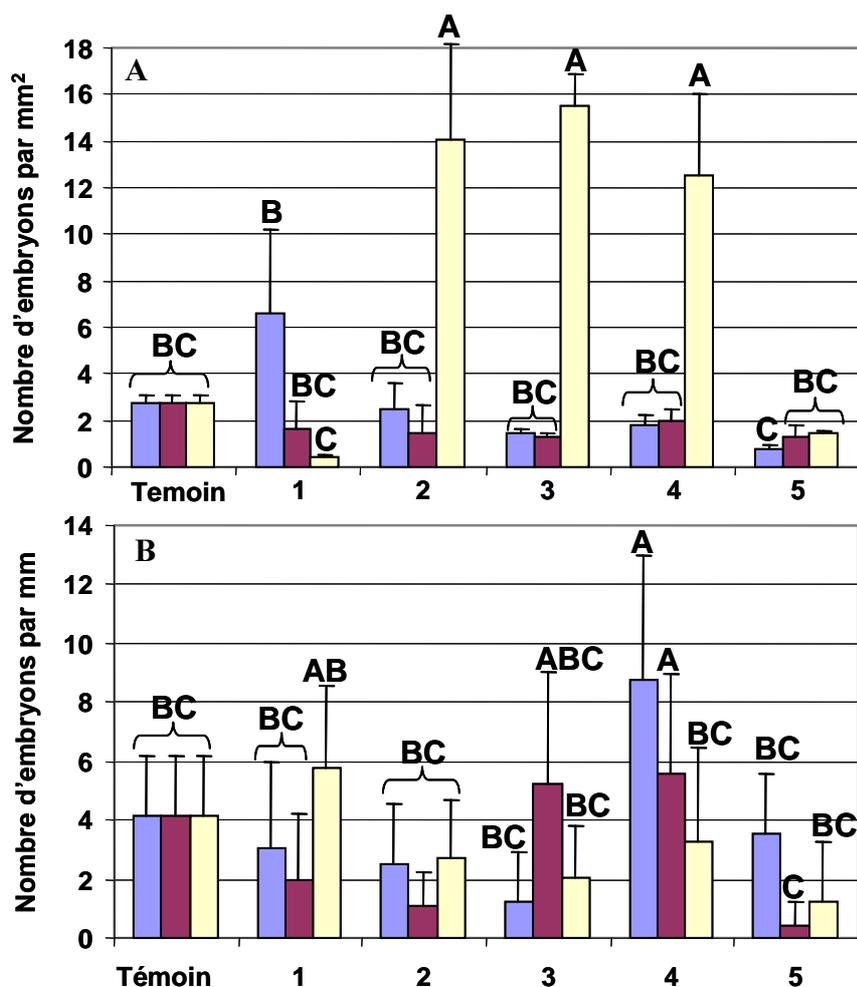


Figure 20: Comparaison du potentiel embryogène du génotype K59 par addition de proline (■), d'un mélange de monosaccharides (■) ou la combinaison proline monosaccharides (■) pendant huit jours de culture de feuille (A) ou de racine (B). 1-5 correspondent aux différentes concentrations en monosaccharides et en proline avec respectivement 0,01 ; 0,1 ; 0,2 ; 2 et 4 $\mu\text{g/ml}$. Les embryons somatiques sont dénombrés par mm^{-2} de feuilles et par mm^{-1} de racines linéaire. Les résultats sont soumis à un test statistique de type Student Newman & Keuls range test. Les moyennes des répétitions avec des lettres différentes sont significativement différentes avec un risque de 5%.

Sur les racines, l'effet de la supplémentation est plus complexe, on observe un effet positif sur la production d'embryons somatiques pour une concentration de 0,01 $\mu\text{g/ml}$ pour l'addition simultanée de proline/sucres. Contrairement aux feuilles, une stimulation de la production d'embryons somatiques est provoquée par l'addition individuelle de 2 $\mu\text{g/ml}$ de proline ou de sucres et pour 0,2 $\mu\text{g/ml}$ de sucres. Ces résultats sont très similaires à ceux obtenus sur l'hybride « 474 » et

confirment la différence de sensibilité et de réactivité entre les feuilles et les racines à l'addition de proline et de monosaccharides.

Afin d'approfondir ces résultats nous avons cherché à vérifier si un seul sucre était suffisant en présence de proline pour modifier le potentiel embryogène, ou si c'était le mélange des sucres qui conduisait à ces effets. Pour cela nous avons incubé des racines de K59 en présence de proline (0,2 mg/ml) et de l'un des cinq monosaccharides utilisés précédemment à différentes concentrations (0,2 ou 1 mg/ml). Dans un souci d'homogénéité des plantes mères et de leurs conditions de culture, nous avons opté pour l'utilisation de vitroplants. En conséquence, nous nous sommes limités pour la suite à des expérimentations uniquement sur les racines provenant de vitroplants du fait de l'inutilisation de la partie aérienne.

Les résultats (figure 21) montrent une réponse très différente selon la nature des monosaccharides utilisés. Ainsi aucun effet n'est observé pour l'addition de N-acetylglucosamine. Lors de l'addition individuelle des autres monosaccharides, un effet positif sur l'augmentation du nombre d'embryon somatique est observé pour une concentration en monosaccharide de 1 $\mu\text{g/ml}$, hormis pour le N-acetylglucosamine, et pour l'addition de N-acétylgalactosamine à 0,2 $\mu\text{g/ml}$. Toutefois, les résultats les plus intéressants sont obtenus pour l'addition simultanée de proline et de galactosamine, où le nombre d'embryons somatiques est quatre à cinq fois supérieur. Dans une moindre mesure, l'addition simultanée de proline et de N-acétylgalactosamine permet aussi d'augmenter le nombre d'embryon somatique. Ainsi la capacité embryogène peut être modifiée par l'apport de monosaccharide et de proline jusqu'à 4 fois par rapport au témoin.

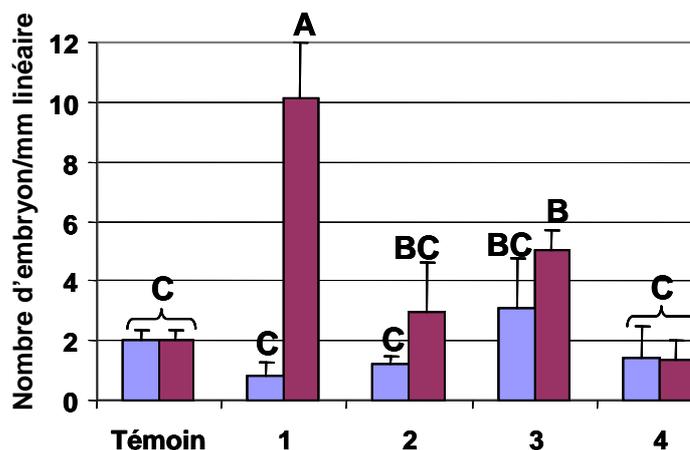


Figure 21: Comparaison du potentiel embryogène des racines du génotype K59 par addition de proline (à 0,2 µg/ml) et d'un monosaccharide (■) 0,2 µg/ml ou (■) 1 µg/ml. 1-5 correspondent aux différents monosaccharides : 1 : galactosamine ; 2 : glucosamine ; 3 : N-acétylgalactosamine ; 4 : N-acétylglucosamine. Les embryons somatiques sont dénombrés par mm⁻¹ de racines linéaire. Les résultats sont soumis à un test statistique de type Student Newman & Keuls range test. Les moyennes des répétitions avec des lettres différentes sont significativement différentes avec un risque de 5%.

Il est à noter que l'effet de l'addition simultanée d'un monosaccharide et de proline donne des résultats plus tranchés au niveau des racines que lors de l'addition d'un ensemble de monosaccharides. Si on peut observer que l'addition de proline et de monosaccharide permet une augmentation de la production des embryons somatiques, le rôle de ces molécules est cependant difficile à préciser. En effet, est-ce que ces molécules jouent un rôle indirect et sont absorbées par les cellules puis métabolisées en molécules jouant un rôle dans l'activation de l'embryogenèse somatique ? Ou alors est-ce que ces molécules jouent un rôle direct comme molécules effectrices tel qu'un stress osmotique occasionné par le mannitol et glucose (Lou *et al.*, 1995), ou dans le cas de la galactosamine y a-t-il un stress oxydatif (Janisch *et al.*, 2004) ou encore dans la transduction de signal (Van Hengel *et al.*, 2001).

Conclusions :

Ces essais ont permis de mettre en évidence une relation entre la capacité embryogène et la quantité d'AGPs libérées dans le milieu de culture. La quantité d'AGPs est toujours plus importante chez le génotype embryogène (« 474 ») que chez les génotypes non (Flash) ou peu (Pévèle) embryogènes. Mais cet effet est aussi observé de façon plus relative, après un prétraitement de « 474 » permettant une augmentation de la production d'embryons.

L'identification et la caractérisation des AGPs libérées dans le milieu de culture sont rendues difficiles du fait d'une grande difficulté de séparation et d'analyse. En effet, de part leur nature fortement riche en sucres, de leur masses importantes, la séparation par gel électrophorétique des AGPs est complexe (smear). Les analyses par HPLC ont cependant permis de mettre en évidence plusieurs fractions d'AGPs. Mais, ces profils ne nous permettent pas de mettre en évidence une famille particulière d'AGPs spécifiques de l'embryogenèse somatique, que se soit pour l'hybride « 474 » ou Koospol.

L'immunolocalisation nous a permis de mettre en évidence un marquage chez « 474 » avec l'anticorps JIM16 au niveau des structures unicellulaires réactivées et sur les structures embryogènes, alors que le marquage est inexistant chez le génotype non embryogène (Flash). Chez les génotypes Koospol, aucune discrimination des structures embryogènes, y compris avec JIM16, n'a été observée.

La modification du milieu de culture par l'addition de proline et de monosaccharide a montré que l'embryogenèse somatique peut-être stimulée par les molécules constitutives des AGPs. Cette stimulation est différente selon

l'organe étudié (racine et feuille) mais cet effet est similaire entre l'hybride 474 et K59. Ceci montre que la structure des AGPs peut jouer un rôle important dans le processus d'activation de l'embryogenèse somatique, mais le décryptage de leur rôle d'inducteur ou effecteur de l'embryogenèse est encore à réaliser.

The background of the slide features a photograph of several purple flowers on a green stem. The flowers are in various stages of bloom, with some fully open and others as buds. The lighting is soft, creating a gentle, natural feel. The text is overlaid on this image.

2^{ème} PARTIE

**DÉTERMINATION DU TYPE
D'AGPs LIBÉRÉES AU COURS DE
L'EMBRYOGENÈSE SOMATIQUE**

Détermination du type AGPs libérées au cours de l'embryogenèse somatique

Etude donnant lieu à l'écriture d'un article soumis à *Planta*

Introduction

Au cours de cette thèse, un des objectifs qui m'avait été confié était la caractérisation des AGPs impliquées dans le processus d'embryogenèse somatique. De par leur nature fortement glycosylée, leur composition et leur localisation, les AGPs peuvent produire lors de leur dégradation de nombreuses molécules signal telles que les AG peptides, des oligosaccharides, ou même jouer le rôle de récepteur ou encore de marqueur d'identité cellulaire.

Par ailleurs, les AGPs peuvent posséder une ancre GPI, et donc faire partie ainsi de la famille des GPI protéines. Leurs rôles sont de plus en plus étudiés de par leur localisation particulière au sein de la membrane plasmique (Sharom et al, 2004). Les AGPs décrites dans l'implication de différents processus du développement apparaissent être des AGP-GPIs telle que la LeAGP1 chez la tomate qui est décelée lors de la différenciation cellulaire (Gao *et al.*, 2000), ou encore la PtaAGP3 chez le pin, au cours de la différenciation du xylème (Loopstra *et al.*, 2000). Ces AGPs à ancre GPI peuvent être des cibles des phospholipases C ou D, qui favorisent leur libération par clivage.

Dans cet article, nous nous intéressons à préciser le rôle des AGPs dans l'embryogenèse somatique chez la chicorée et à déterminer si les AGPs secrétées dans le milieu de culture pourraient être des AGP-GPIs.

PLANTA

GPI-anchored AGPs are released during somatic embryogenesis in *Cichorium*

David WINDELS, Ildephonse HABARUGIRA, Anne-Sophie BLERVACQ*, Jean-Pierre ZANETTA⁺, Yves LEROY⁺, Bruno DELBREIL, Marie-Christine QUILLET, Estelle GOULAS, Jean-Paul COUILLEROT, Jean-Claude MICHALSKI⁺, Jean-Louis HILBERT.

Laboratoire de Physiologie de la Différenciation Végétale, UPRES-EA 3569/ERT1016/IFR118, Université des Sciences et technologies de Lille, Bâtiment SN2, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

⁺ Laboratoire de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, Unité Mixte de Recherche 8576 CNRS, Université des Sciences et technologies de Lille, Bâtiment C9, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

Author for correspondence * E-mail: blervacq@univ-lille1.fr

Tel: 00-33/ 03 20 40 16

Fax: 00-33/ 03 20 33 71 77

ABSTRACT

AGPs are proteoglycans of the Hydroxyprolin Rich GlycoProteins (HRGP) family and are implicated in several developmental processes. In an interspecific hybrid of *Cichorium*, AGPs have been shown to be essential for somatic embryogenesis (SE) (Chapman et al. 2000). Since we have halfsib genotypes sharing similar background, we achieved a comparison, of quantities of secreted AGPs, between an embryogenic (K59) and a less embryogenic (K28) genotype. The results confirmed that secreted AGPs are closely related to SE capacity in *Cichorium*. Cytological analyses showed that the first divisions of embryogenic cells corresponded to the start of AGPs secretion. Using PLC inhibitors (neomycin and U73122) (Evdonin et al. 2004), AGPs were no longer released in culture medium and the presence ethanolamine, glucosamine and inositol components suggest that i) released AGPs are GPI-anchored proteins, and that ii) AGPs could be implicated in cell division (i.e. expression phase in SE or other pathways).

Key words: Arabinogalactan proteins-Glycosylphosphatidylinositol-*Cichorium*-Inhibitor Phospholipase C-Somatic embryogenesis

INTRODUCTION

Somatic embryogenesis (SE) can be used as an alternative method for studying early zygotic embryogenesis. The facility of production and the accessibility of somatic embryos permitted a better understanding of the different steps of this process. Arabinogalactan proteins (AGPs) have been shown to be necessary for SE in an interspecific *Cichorium* hybrid (Chapman et al. 2000), as previously observed in other model like the carrot (Kreuger et al. 1993). These highly glycosylated proteins belong to the HRGP (Hydroxyprolin rich glycoproteins) family, constituted by a hydroxyproline-rich core protein (1 to 10% of the glycoprotein) O-glycosylated by arabinose and galactose (90 to 99% of the glycoprotein) (Showalter et al. 1989). AGPs have been subdivided in two categories “classical“ and “no classical“ AGPs. Classical AGPs could be have a GPI anchor and so they are called AGP-GPIs (Borner et al. 2002).

The implication of AGPs in different process such as SE (Kreuger et al. 1995; Egertsdotter et al. 1995), programmed cell death (Chaves et al. 2002; Gao et al. 1999), cellular growth (Willats et al. 1996), and cellular development (Mollet et al. 2002) has been commonly admitted. However, their mode of action remains understood. A major reason for this lack of knowledge is related to the structural complexity of these molecules. In fact, the heterogeneity in their composition and localization may confer to them the possibility to play different roles (Showalter 2001).

To clarify putative relationships between the secretion of AGPs in the culture medium of SE and the embryogenic potential of the explant, we have focused on new halfsib genotypes derived from an East-european population designated as Koospol. In this population a high embryogenic genotype K59 and a less embryogenic genotype K28 were identified. In order to understand the function of AGPs during SE expression, AGPs secretion and cytological events were followed. Some AGPs have been described as putative GPI anchor protein, known to be the target of phospholipase C (Schultz 1998). Thus, we used inhibitors of Phospholipase C (PLC) to confirm the AGP-GPI nature of the AGPs released during SE in chicory. The implication of these molecules during the SE pathways is discussed.

MATERIAL AND METHODS

Plant material and culture conditions.

Plantlets of a *Cichorium* K59 (*Cichorium intybus* L. var. pop Koospol) were propagated by direct somatic embryogenesis from roots and K28 by organogenesis from leaf explants. The plantlets were subcultured for 6 weeks on solid Heller medium (Heller 1953) containing 15 mM sucrose, 2.25 mM inositol and vitamins according to Morel and Wetmore (Dubois et al. 1991). The growth conditions were 12 h light, 24C°/ 12 h dark, 20C°, photoperiod with a photon flux rate of 50 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Induction and expression of somatic embryogenesis.

Roots of six-week-old plantlets were cut and placed in standard SE induction medium (Blervacq et al. 1995; Bellettre et al. 2001) consisting of half-strength Murashige and Skoog (1962) medium, containing 10.1 mM KCl instead of KNO_3 , 1.7 mM glutamine, microelements of Heller (1953), 5×10^{-5} M Fe-EDTA, vitamins of Morel and Wetmore, and 60 mM sucrose. SE was achieved after 8 days at 35°C in darkness in agitated liquid medium.

Infiltration with JB4 wax.

Roots were fixed in a formaldehyde/acetic acid/ethanol solution (3.6 / 6.5 / 90, v/v/v) (FAE), dehydrated through a range of increasing concentrations of ethanol and infiltrated with JB4 wax (Polysciences). Sections of three μm were cut on a Leica RM 2065 microtome and stained with Toluidine blue (0.5 % w/v in aqueous solution). The number of embryonic cells and embryos was counted. Four classes were notified: Reactivating cell: RgC; Reactivated cell: RdC; Dense cells areas (embryo and promeristematic area) and Vacuolated cells areas.

Immunolocalisation of AGPs.

After eight days (D8) of culture, roots fragments were fixed, dehydrated as described previously and infiltrated with n-Butyl-Methyl-Methacrylate resin (TAAB). Thin section (3 μm) were blocked with 0.05 % v/v Tween 20 in phosphate buffered saline (PBS: 100 mM K-phosphate, 138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.4) containing 0.1% w/v BSA (PBST) for 30 min. Sections were incubated with 1:5 dilutions (in PBST buffer) of AGP monoclonal antibodies [Generously provided by Dr J.P Knox (Univ. Leeds, U.K.) and Dr K Roberts (John Innes Institute, Norwich, U.K.)] at room temperature for 1 h and washed three times with PBS buffer before incubating with a 1:100 dilution (in PBS buffer) of goat anti-rat IgG-

fluorescein isothiocyanate-(FITC)-conjugated secondary antibodies (Jackson Immunoresearch Lab., Baltimore, Md., USA) for 1 h at room temperature. After extensive washing in PBS, sections were examined under an Olympus BH-2 fluorescence microscope.

Isolation of secreted AGPs.

Extracellular AGPs were isolated from the culture medium with $\beta(1.3 \text{ DGlc})\text{Yariv}$ reagent as previously described by Kreuger and Van Holst (1995) and were quantified by single radial diffusion (Van Holst et al. 1985).

Treatment of plasma membrane and root with PLC

Plasma membranes from leaves of K59 were isolated as described in Larsson et al. (1987). Plasma membranes were extracted from leaves according to the quantity of plant material available (110g of fresh weight was necessary to extract membrane). Plasma membranes were resuspended in 10 mM HEPES/NaOH pH 7.4 and incubated with *Bacillus cereus* PI-PLC (Sigma-Aldrich) at a concentration of 10 units/mL. After three hours of incubation at 30°C (Droillard et al. 1993), the sample was desalted over a PD10 column (Amersham) and AGPs were quantified by single radial diffusion. Controls were achieved at 4°C in presence of PI-PLC or at 30°C in absence of PI-PLC.

Culture of K59 with neomycin.

Six-week-old K59 roots were cultivated in presence (half of root) or in absence (the other Half) of neomycin (Sigma-Aldrich) during eight days of SE induction. The inhibitor was added every 48 hours to the culture medium at different concentration (25, 100 and 200 μM). After eight days, secreted AGPs and roots were collected separately. AGPs were quantified and the number of somatic embryos was determined as described previously (Helleboid et al. 1995).

Culture of K59 roots with U73122 and U73343.

Six-week-old K59 roots were cultivated during 8 days under SE induction condition in the presence of U73122 (Sigma-Aldrich), an inhibitor of Phospholipase C activities, or in the presence of U73343, an inactive analogue molecule of U73122. Both compounds were solubilized in ethanol were added every 48 hours to the culture medium at different concentration (1, 2.5 and 5 μM). U73122 and U73343 were resuspended in ethanol. After 8 days, secreted AGPs and roots were collected. AGPs were quantified and the number of somatic embryos was determined.

Sequential GC/MS analysis of AGPs.

100 µg of purified and desalted extracellular AGPs were analyzed for their monosaccharides, ethanolamine and inositol content by two step GC-MS procedure after methanolysis and acid hydrolysis by heptafluorobutyrate (HFB) derivatization as described by Pons et al. (2003).

RESULTS

Somatic embryogenesis requires the dedifferentiation and re-differentiation of somatic cells. In order to know the different events occurring during SE, roots of the genotypes K59 (embryogenic) and K28 (less embryogenic) were cultivated during eight days. After 8 days, roots were fixed and semi-thin sections of roots from both genotypes were analyzed (figure 1). The first unicellular event is cell reactivation. Nucleus becomes bigger (reactivating cell) (figure 1B). Then, some reactivated cells (figure 1C) enter in a segmentation pathway of division, giving rise to a somatic embryo containing small dense cytoplasmic cells (figure 1D, 1E). Another pathway of division can be detected but the cytoplasm of these cells are not dense (figure 1F) therefore, no embryo-like structure can be seen but organogenic structure. These genotypes K59 and K28 differ by their capacity to form dense cells areas and so by their capacity to product embryos.

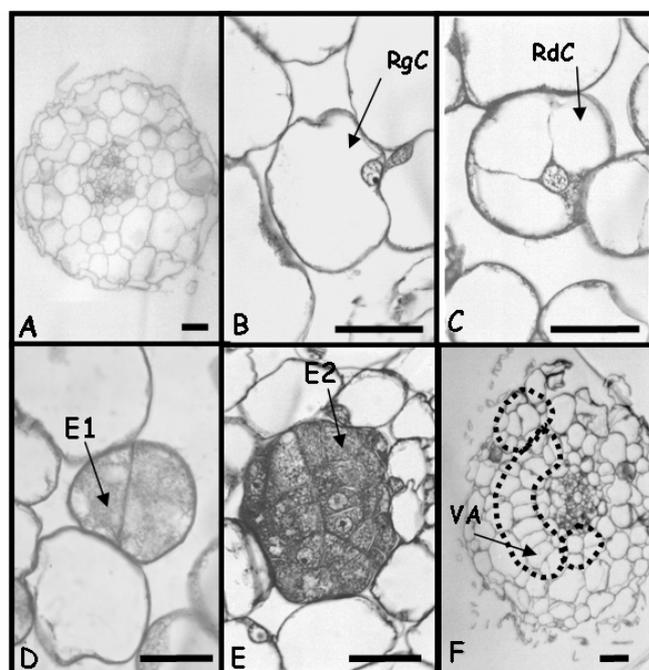


Figure 1: Early cellular events occurring during *Cichorium* somatic embryogenesis in K59 root semi-thin sections during the eight days of embryogenesis. A: root before culture; B-F: root tissues submitted to SE condition. B: reactivating cell: RgC; C: reactivated cell: RdC; D: bicellular embryo (E1) showing dense cells; E: multicellular embryo (E2) showing very dense cells; F: vacuolated area (VA) were characterized by highly vacuolated cells which grew via anticlinal mitosis. Bar: 20 μ m.

After 8 days of culture, AGPs were collected and quantified for both genotypes. As show in Figure 2, the quantities of AGPs released by the embryogenic and less embryogenic genotype differed significantly. After eight days of culture, AGP quantity was about five-fold higher in K59 (11 μ g/ml) than in K28 (2.5 μ g/ml). These results suggest a correlation between the quantity of AGPs released in the culture medium and embryogenic potential.

Quantity of AGP μ g/mL medium

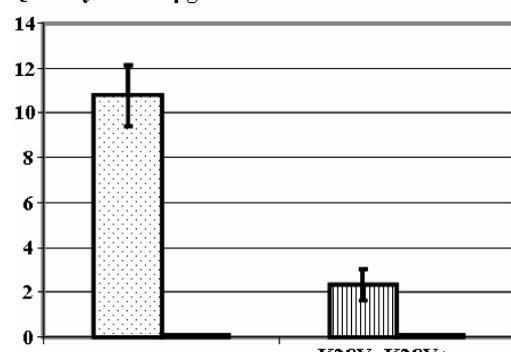


Figure 2: Quantities of AGPs released in the medium after 8 days of roots culture treated with 250 μ M of β -D-Glc Yariv (Y+) or non-treated (Y-). Embryogenic genotype (K59) and less-embryogenic (K28) were tested.

A comparison of the cellular events between K59 and K28 (figure 3) showed a difference in the number of dense area between both genotypes, being more important in K59 than in K28. The same analyze was realized after culture in presence of 250 μ M Yariv reagent. In presence of Yariv all cellular event had decreased, especially the number of dense area which was found to be 8 fold lower in treated K59 (Y+) than in non-treated K59 (Y-). Moreover, the quantification of AGPs (figure 2) shows that AGPs are not secreted in the culture medium when using Yariv reagent. So Yariv inhibited the secretion of AGPs as much as the capacity to produce dense cells areas, whereas other cellular events seemed less affected. Yariv altered specifically the embryogenic pathway and the secretion of AGPs in the medium.

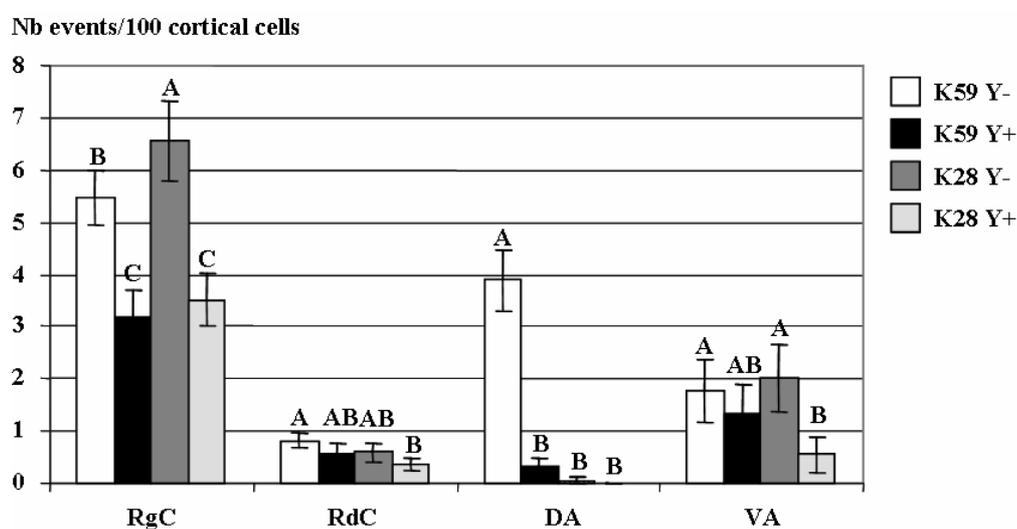


Figure 3: Quantification of uni- and multicellular events occurring in root semi-thin sections after 8 days of culture in absence K59Y-, K28Y-, or presence of Yariv reagent K59Y+, K28Y+. RgC: reactivating cell, RdC: reactivated cell, DA: dense area and VA: vacuolated area. Data were submitted to Student-Newman-Keuls statistical test (glm.SAS: global linear model. Statistics Analysis System). Results are shown where means followed by different letters are significantly different at 95% confidence level.

The induction and expression of somatic embryogenesis occurred all over the culture (i.e. 8 days). The first event was the cellular reactivation which appears after two days of culture. At day 3, reactivated cells and first divisions occurred. After day 6, multicellular embryos were observed (figure 4). AGPs were quantified at different days of culture. Figure 5 shows that AGPs were secreted from day three, which corresponds to the first division of the reactivated cells.

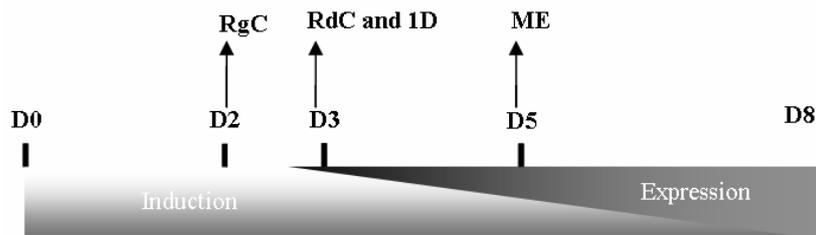


Figure 4: Representation of cellular events observed during SE induction. RgC: reactivating cell, RdC: reactivated cell, 1D: embryo of two cells state and ME: multicellular embryo state.

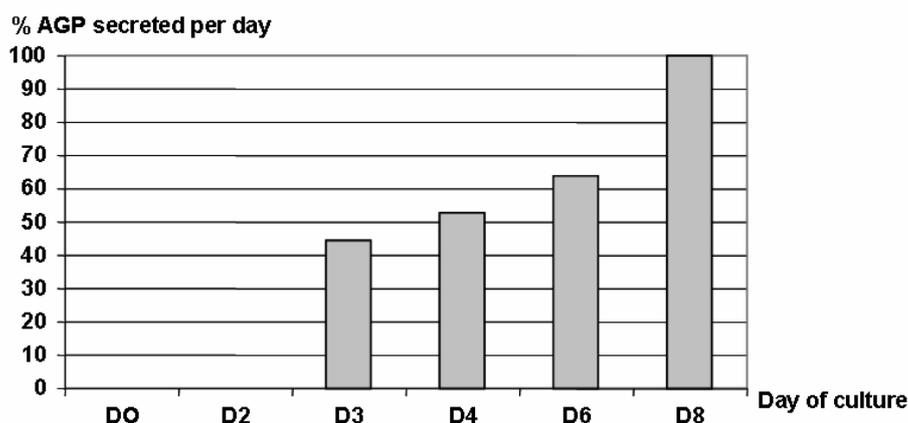


Figure 5: Time course of AGPs released in the culture medium during 8 days of K59 root culture. Value obtained by mixing culture medium from four independent cultures. AGPs were precipitated and quantified by single radial diffusion gel.

To identify AGP in relation with SE structure, monoclonal antibodies specific to AGP carbohydrate epitopes were used and tested in root semi-thin sections of K59 and K28 genotypes in order to associated an epitope to SE structure (Figure 6A). No real difference was observed between K59 and K28 whatever the pathways expressed. The same epitopes were detected in both. However, outer cell walls of the young somatic embryos or RgC peripheral cells were brightly immunolabelled (figure 6B). But, we can also observe some luminous spots on plasma membrane (figure 6C). This experiments show that the only difference between K59 and K28 is in their capacity to release AGPs. So this release seems to be necessary to trigger obtain SE expression. Indeed, K59 roots cultivated in presence of 250 μM of $\beta\text{-D-Glc}$ Yariv gave no somatic embryos. The induction phase still occurred as RgC and RdC could be observed. Very few AGPs can be quantified in the culture medium. In contrast, more dense areas are labeled with LM2 and the plasma membrane appears some times thicker (figure 6D). Such antibodies were also tested on secreted AGPs by immunoblots. All antibodies tested reveal the presence of AGPs secreted from K59 and K28 and no significant differences were observed between both genotypes.

A

Antibodies	Genotypes	Events			Localization in root tissues
		RgC RdC	DA	VA	
JIM8	K59	++	-	+	Vascular tissues, especially phloem poles, cortex and epidermis
	K28	+	nd	-	
JIM13	K59	+	-	+	Alls cells, especially xylem and somatic embryos (outer cell walls of peripheric cells)
	K28	++	-	+	
JIM14	K59	++	-	++	Cortex, Phloem, somatic embryo surface (outer cell wall of peripheric cells)
	K28	++	-	++	
JIM16	K59	+	-	nd	Vascular tissues, weak signal on cortical cells
	K28	+	nd	-	
LM2 MAC207	K59	++	++	++	everywhere
	K28	++	++	++	

Figure 6: Localization of AGPs epitopes recognised by JIM, MAC207 or LM2 antibodies on semi-thin root sections of K59 (embryogenic) or K28 non-embryogenic) genotypes, roots were cultured 8 days. A: Table representing the intensity of labelling: + to ++: strong signal, - weak signal of epitopes on root semi-thin sections. nd: not determined. B: Semi-thin section of K59 labelled with JIM14. Reactivated cells (RdC) are strongly labelled. Dense cytoplasm-rich cells Areas (DA) corresponding to somatic embryos exhibit less labelling on their cell surface. Bar = 20 μ m. C: Magnification of reactivating cells in K59 labelled with JIM 14. Labelling is observed in perinuclear cytoplasm. Some bright areas are scarcely distributed along plasma membrane (arrow heads). Bar = 10 μ m. D: Semi-thin section of root from K59 cultivated in medium supplemented with β -D-Glc Yariv during 8 days (labelling with LM2). While very few AGPs were quantified in the medium, a lot of areas are strongly labelled with LM2 (arrow heads). In some places, plasma membrane appears thicker (double asterisks). Bar = 10 μ m. Anti-rat secondary antibodies were conjugated with FITC.

Therefore, no qualitative differences in AGPs were observed but only quantitative ones. This release of AGPs was necessary to SE expression. According to the classification of

AGPs, some of them could be GPI-anchor proteins. So, different experiments were undertaken to verify if AGP-GPIs could be involved in SE.

To demonstrate the presence of AGP-GPIs in plasma membranes in chicory, plasma membranes isolated from leaves of K59, then treated with PI-PLC. Released AGPs were quantified by single radial diffusion. As shown in Figure 7, PI-PLC treatment of plasma membranes released AGPs, this in contrast to the control conditions (+PLC 4°C and -PLC 30°C). This result suggests the presence of AGP-GPIs in plasma membrane.

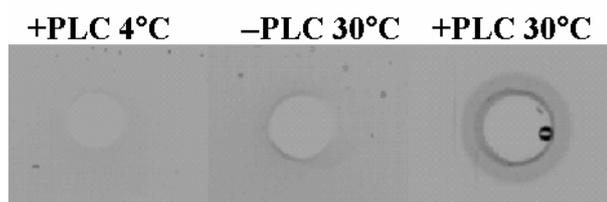


Figure 7: Quantification of AGPs after PLC treatment on plasma membranes. Plasma membranes were firstly isolated as described by (Larson et al. 1987), then incubated with (+), or without (-) 10 units/mL of PI-PLC at different temperature. The release of membranous AGPs were detected by single radial diffusion. Membranes treated in +PI-PLC 30°C condition release AGPs.

In order to modify the release of potentially AGP-GPIs, we have used neomycin a PLC inhibitor. Neomycin was added into the culture medium of K59 roots during the eight days of culture at various concentrations 25, 100 and 200 μ M. Table 1 shows that the addition of neomycin inhibits completely the secretion of AGPs in the culture medium whatever the concentration used. Semi-thin sections of treated root with or without neomycin were realized and analyzed (figure 8). In presence of the inhibitor, no embryos were produced and none other structures were observed.

Table 1: Quantity of AGPs released in neomycin-treated root after 8 days of culture. Neomycin was dissolved in water and added every 48h during the culture.

	25 μ M	100 μ M	200 μ M	Control
Quantity of AGPs μ g/ml medium	0	0	0	5.52 \pm 1.58

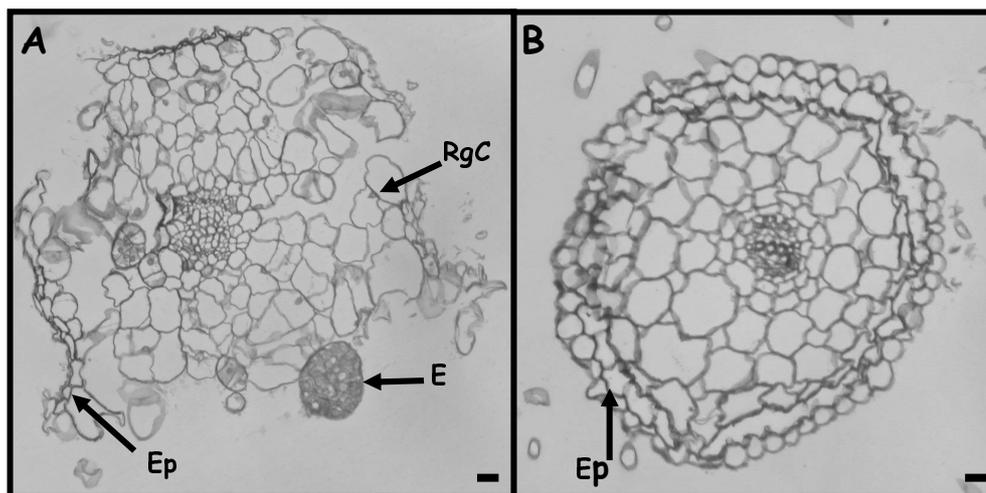


Figure 8: Effects of neomycin treatment on cellular events. A: Semi-thin sections of K59 non-treated roots. After 8 days of culture, root appeared disorganized and some cortical cells were disrupted. No event occurs in the stele. Embryos appeared in the cortex and are easily released in the medium, B: Semi-thin sections of K59 roots treated with 25 μM of neomycin during 8 days of culture. No cellular or multicellular events are distinguished. Bar: 10 μm . Ep: epidermis, E: embryo, RgC: reactivating cell.

To reinforce AGP-GPI nature of these AGPs, we decided to use a second inhibitor U73122 and its inactive analogue U73343. The problem of these molecules is that they are soluble only in DMSO or ethanol known to alter plant tissues. To test the effect of the solvent, cultures were achieved with ethanol or with DMSO and the quantity of AGPs was determined. Figure 9 shows that the presence of DMSO inhibits more the released of AGPs than ethanol. U73122 and U73343 were thus solubilized in ethanol. Half roots of K59 were cultivated with U73122 and the other half with U73343 at various concentrations: 1, 2.5 and 5 μM during 8 days of culture. After 8 days of culture, roots and secreted AGPs were collected separately. AGPs were quantified and roots analyzed in semi-thin sections. Figure 9 shows that U73122 partially inhibits the secretion of AGPs in the culture medium at 1 and 2.5 μM (less 50%), and almost totally at 5 μM . In the same time, the induction of embryos was affected as showed the semi-thin sections of treated root or control roots (figure 11). After U73122 treatment, no dense area could be observed.

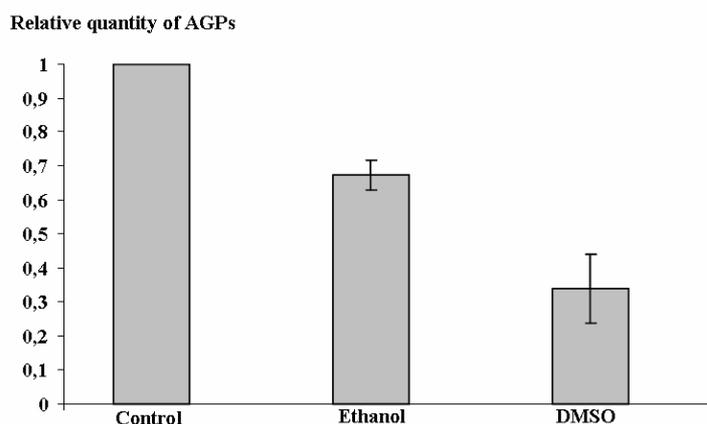


Figure 9: Effects of ethanol and DMSO on AGPs release. Relative quantity of AGPs secreted after 8 days of culture in presence of ethanol or DMSO (addition 300 μL) are normalized compare to control.

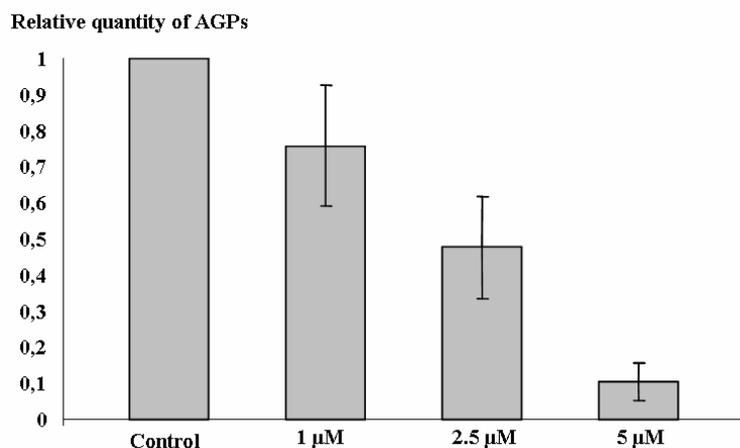


Figure 10: Effects of U73122 on AGPs secretion. Relative quantity of AGPs secreted, after 8 days of culture in presence of different concentration of U73122, are normalized in comparison to controls. Each Control (U73343) were applied us the same concentration asthat U73122.

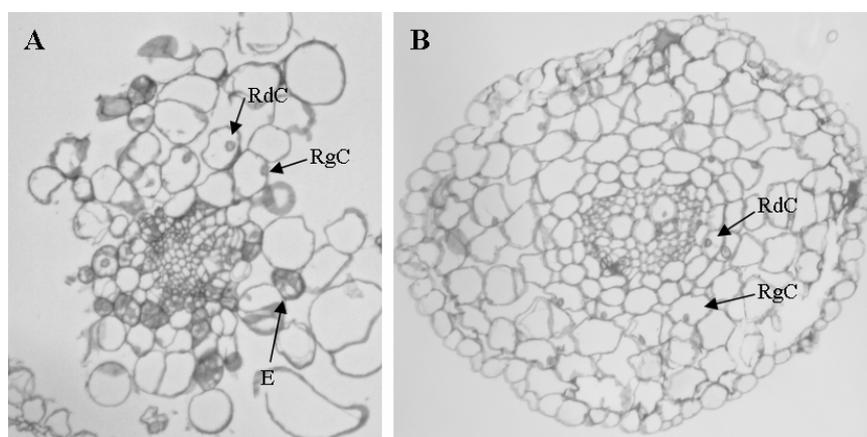


Figure 11: Effects of PLC inhibitors treatments on SE in K59 root. A: Semi-thin sections of K59 roots after treatment with 5 µM U7343 treatment, the root appears disorganized, all structures are present. B: Semi-thin sections of K59 roots after treatment with 5 µM U73122:

the root left unchanged and not disorganized. No embryogenesis structures could be observed, only cells reactivating and reactivated were observed. Bar: 10 µm.

In order to provide evidence for a GPI anchor on extracellular AGPs, 100 µg of AGPs were purified and analyzed by two successive GC/MS analyses on the same sample. The first step consisted in an acid-catalyzed methanolysis (figure 12A) and the second step in a strong acid hydrolysis (figure 12B) followed both by a HFB derivation and GC/MS analysis. The result of methanolysis showed several interesting features (Table 2). The dominant constituents were arabinose (Ara) and galactose (Gal). Other monosaccharides were present as mannose (Man), glucose and galactosamine. But the mainly is the detection of ethanolamine (EtNH₂) (RT = 4.35). The result of second step showed the presence of glucosamine (GlcN) (RT = 14.12) and inositol (Ins) (RT = 21.41) (and again ethanolamine). These compounds are not detected during the first step because the bond between glucosamine and inositol is not cleaved by the acid-catalyzed metanolysis due to the shielding effect of the protonated NH₂ group of glucosamine of glucosamine on the cleavage of the adjacent glucosidic bond. But this bond is cleaved by acid hydrolysis. Nevertheless, the total

absence of the HFB derivative of O-methyl-glycoside of glucosamine (as the absence of the HFB derivative of glucosamine resulting from the first GlcNAc residue of N-glycans) was indicative that none of the glycans was N-linked. Consequently, these data, taken together, clearly demonstrated that AGPs present a GPI anchor.

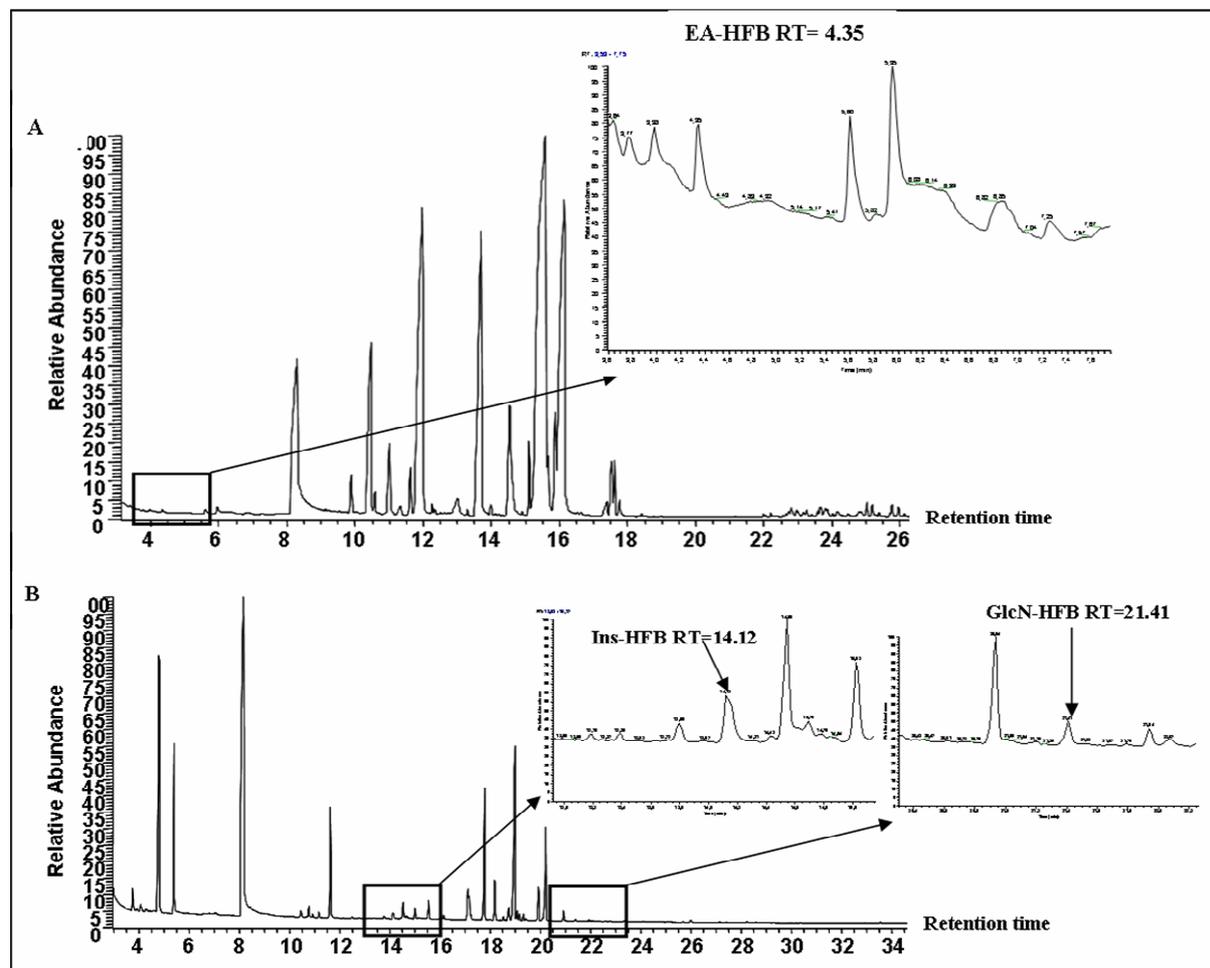


Figure 12: Chromatogram of the GC/MS (EI mode of ionization) of the constituents of extracellular AGPs as HFBA derivatives. A: analysis of glycosides; B: analysis of amino acids. EA-HFB: HFB derived ethanolamine, Ins-HF: HFB derived inositol, GlcN-HFB: HFB derived glucosamine.

Table 2: Results of the GC/MS analyses. Data are expressed as the molar ratio relative to EtNH₂ of the different compounds liberated by acid-catalyzed methanolysis (step 1) and by acid-hydrolysis (step 2). * the data concerned are not significant since these compounds are in large part destroyed during acid hydrolysis.

	EtNH₂	Man	GlcN	Ins	Ara	Gal	Glc	GalN
Step 1	1.000	4.302	0	0	527.660	1001.470	22.005	26.688
Step 2	1.000	*	0.865	0.914	*	*	*	*

DISCUSSION

In *Cichorium* var. Koospol, we observed that AGPs were released in the culture medium in relation with SE capacity. Genotypes of Chicory chosen here are half-sibs and are originated from the same population. They share similar genetic background and were chosen for studying SE inheritance. The AGPs quantification has been determined according to the different genotypes tested. It seemed that the quantification of AGPs could be used as an easy and fast test to classify genotypes according to their ability to produce or not somatic embryos. Moreover, the AGPs level of secretion seemed not to be related to the number of embryos produced and should be used as a qualitative parameter.

We have previously demonstrated that the addition of β -D-Glc Yariv during the culture totally inhibited SE pathway in an interspecific hybrid of *Cichorium* (Chapman et al. 2000). Here, we focused our attention on the impact of β -D-Glc Yariv at the cellular level, the appearance of the SE events and their level according to the genotypes. This plant material yielded us the possibility to observe different pathways: organogenesis (bud), embryogenesis and the production of vacuolated cells. Here we noticed that β -D-Glc Yariv depleted the SE pathway. The other pathways were not greatly modified suggesting that the set of AGPs was mainly necessary to the SE pathway. Quantification of AGP levels showed us that the secretion of AGPs in the culture medium was greatly decreased. Two hypotheses can be proposed: either AGPs were precipitated by Yariv in the culture as they were released or the level of AGPs was affected. Because we have previously determined that Yariv reagent could migrate through root cortex but was not detected in vascular stele (Chapman et al. 2000), we suggest that AGPs are not released in the medium and are directly precipitated in situ. Therefore, less AGPs were accumulated in the medium.

The relationship between SE production and secreted AGPs level led us to focus on the AGP-GPI class. In this case, release of AGP part was controlled by the action of a phospholipase C (PLC). Consequently, we tested different inhibitors of this enzyme. We have still observed a few cell reactivations and sometimes the first cell division, but no somatic embryos (nor buds) were noticed in presence of both inhibitors. We also determined that the level of AGPs in the medium decreased dramatically. Neomycin altered all phases (induction and expression) whereas U73122 was more drastic on mitosis as induction was observed with cell reactivation events. We can suggest that the release of AGP-GPIs were a prerequisite for mitosis. Such relationships were already noticed with AGP18 which was related to mitosis during female gametogenesis in *Arabidopsis* (Acosta et al. 2004). It appears that AGP18

could exhibit a GPI anchor. Nevertheless, the use of PLC inhibitor could also alter the release of the other GPI-proteins involved in cell cycle. Moreover, Echeverria et al. (2004) established that PLC could be activated by spermine. We have previously shown that great modifications of polyamines levels occurred during SE in the interspecific Chicory hybrid (Bellettre et al. 2000). The implication of such polyamines during SE or the effects of exogenous addition could be further tested on Koospol genotypes.

To confirm the hypothesis of an implication of AGP-GPI in SE pathway, we combined GC/MS process to PLC inhibition. The results clearly demonstrated that most of the AGPs released in the medium were AGP-GPI. We suggest that the action of PLC could release AGP in the medium and simultaneously could stimulate signal transduction pathway in the plasma membrane via DAG (diacylglycerol) and/or IPG (inositolphosphoglycan) as proposed by Sharom et al. (2004). However, the AGP degradation by chitinase should also be explored as chitinases were already detected in *Cichorium* medium during SE (Hellebois et al. 1995). In fact, Van Hengel et al. (2001) showed that carrot chitinases degraded N-acetyl glucosamine residue on AGPs during carrot SE, compounds which are able to increase somatic embryogenesis.

Using the K59 and K28 genotypes, three main pathways can be induced. All of them were preceded by a cell reactivation phase (induction), then mitosis and multicellular structures were obtained and process differed (expression). In our genotypes, if SE did not expressed (cf Yariv treatment), the others could be noticed. SE pathway in Koospol Chicory seemed to be dependent on the AGPs release event even if the molecular mechanism is not yet deciphered. Moreover, K28 could give rare somatic embryos and some division occurred. The future progeny obtained from autopolllination of K59 (high embryogenic genotype) is under way and will be of great interest if we can discriminate a genotype exhibiting absolutely no cell reactivation and thus no further mitosis.

According to immunolocalization of carbohydrate epitopes of AGPs with different monoclonal antibodies (Yates et al. 1996), we have observed particular labelling on the plasmalemma in non-treated and β -D-Glc Yariv treated roots. Some signals were also noticed near, or in, the vacuole. Roy et al. (1998) have shown that JIM13 labeled the secretory vesicles and the plasmalemma in Lily pollen tube tip. These authors suggested that Yariv reagent could perturb the plasmalemma-cell wall interface by binding secreted AGPs while exocytosis of vesicle contents still occurs. The consequence would be the enlargement of the periplasm due to the accumulation contents. In previous works, we have already observed that

the Yariv reagent could penetrate into the root tissues and stained the cortical cell walls (Chapman et al. 2000). Such an observation of an enlargement of labelling in the plasmalemma-periplasm region of cortical cells (Fig. 6D) therefore is in accordance with the hypothesis proposed by Roy et al. (1998). Considering the control root culture, we can suggest that JIM antibodies could cross-react with AGPs present in secretory vesicles or with AGP-GPI which are anchored in plasmalemma (Schultz et al. 1998). Labelling could be linked with specific plasmalemma region devoted to exocytosis of AGPs, or AGP-GPI rich regions. Such GPI-anchored proteins are known to be sorted into rafts microdomains before transport to the membrane surface. This kind of localization is assumed to be involved in the signal transduction processes (Sharon and Letho 2002, Anderson and Jacobson 2002).

In conclusion, we have established a relationship between SE ability and the level of AGPs secretion. Embryogenic genotypes produce high level of AGPs and this parameter will be further used to screen new progeny of Chicory more or less embryogenic. We showed that the inhibition of AGPs secretion by Yariv reagent affected the SE pathway specifically as the other pathways were less altered. GC/MS analysis demonstrated that most of these AGPs were AGP-GPI. Such release of the AGP by PLC is necessary to SE as the inhibitors of PLC decreased embryos production. However, the AGPs roles during SE remain still unknown and confirming the complexity of their action.

Acknowledgments

D.W is granted to a doctoral fellowship from the Ministère de l'Éducation et de la Recherche for his PhD. Christelle Roelstraete helped us for immunocytology during her BSc training period. Thanks to Dr. S. Alvarez for her help in statistic analyses. Prof. Théo Hendriks (USTL) is thanked for critical reading of the manuscript and valuable discussion.

REFERENCES

- Acosta-Garcia G, Vielle-Calzada JP (2004) A classical arabinogalactan protein is essential for the initiation of female gametogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16:2614-2628. DOI 10.1105/tpc.104.024588
- Anderson RG, Jacobson K (2002) A role for lipid shells in targeting protein to calveolae, raft, and other lipid domains. *Science* 246: 1821-1825. DOI: 10.1126/science.1068886
- Blervacq AS, Dubois T, Dubois J, Vasseur J (1995) First divisions of somatic embryogenic cells in *Cichorium* hybrid "474". *Protoplasma* 186:163-168. DOI: 10.1007/BF01281326
- Bellettre A, Couillerot JP, Blervacq AS, Aubert S, Gout E, Hilbert JL, Vasseur J (2001) Glycerol effect both carbohydrate metabolism and cytoskeletal rearrangements during the induction of somatic embryogenesis in chicory leaf tissues. *Plant Physiol Biochem* 39:503-511. [DOI 10.1016/S0981-9428\(01\)01263-3](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(01)01263-3)
- Borner GHH, Sherrier DJ, Stevens TJ, Arkin IT, Dupree P (2002) Prediction of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 129:486-499. DOI 10.1104/pp.010884
- Cary LA, Cooper JA (2000) Molecular switches in lipid rafts. *Nature* 404:945-947. DOI 10.1038/35010257
- Chapman A, Blervacq AS, Vasseur J, Hilbert JL (2000) Arabinogalactan-proteins in *Cichorium* somatic embryogenesis: effect of beta-glucosyl Yariv reagent and epitope localisation during embryo development. *Planta* 211:305-314. DOI 10.1007/s004250000299
- Chaves I, Regalado AP, Chen M, Ricardo CP, Showalter AM (2002) Programmed cell death induced by (β -D-galactosyl)₃ Yariv reagent in *Nicotiana tabacum* BY-2 suspension-cultured cells. *Physiologia Plantarum* 116:548-553. DOI 10.1034/j.1399-3054.2002.1160414.x
- Dubois T, Guedira M, Dubois J, Vasseur J (1991) Direct somatic embryogenesis in leaves of *Cichorium*: a histological and SEM study of early stages. *Protoplasma* 162:120-127.

Droillard M.J., Rouet-Mayer M.A., Bureau J.M., Lauriere C (1993) Membrane-Associated and Soluble Lipoyxygenase Isoforms in Tomato Pericarp (Characterization and Involvement in Membrane Alterations). *Plant Physiol* 103: 1211-1219.

Echevarria-Machado I, Ku-Gonzalez A, Loyola-Vargas VM, Hernandez-Sotomayor SM (2004) Interaction of spermine with a signal transduction pathway involving phospholipase C, during the growth of *Catharanthus roseus* transformed roots. *Physiol Plant* 120:140-151. DOI 10.1111/j.0031-9317.2004.0212.x

Egertsdotter U, von Arnold S (1995) Importance of arabinogalactan proteins for the development of somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies*). *Physiologia Plantarum* 93:334-345. DOI 10.1034/j.1399-3054.1995.930219.x

Evdonin AL, Guzhova IV, Margulis BA, Medvedeva ND (2004) Phospholipase c inhibitor, u73122, stimulates release of hsp-70 stress protein from A431 human carcinoma cells. *Cancer Cell Int.* 4:2. DOI 10.1186/1475-2867-4-2.

Gao M, Showalter A.M (1999) Yariv reagent treatment induces programmed cell death in Arabidopsis cell cultures and implicates arabinogalactan protein involvement. *Plant J* 19:321-331. DOI 10.1046/j.1365-313X.1999.00544.x

Helleboid S, Couillerot JP, Hilbert JL, Vasseur J (1995) Inhibition of direct somatic embryogenesis by α -difluoromethylarginine in a Cichorium hybrid: effects on polyamine content and protein patterns. *Planta* 196:571-576. DOI 10.1007/BF00203658

Heller R (1953) Recherche sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés *in vitro*. *Ann Sci Nat Bot Biol Veg* 14:1-223.

Kreuger M, van Holst GJ (1995) Arabinogalactan-protein epitopes in somatic embryogenesis of *Daucus carota* L. *Planta* 197:135-141. DOI 10.1007/BF00239949

Kreuger M, van Holst GJ (1993) Arabinogalactan proteins are essential in somatic embryogenesis of *Daucus carota* L. *Planta* 189:243-248. DOI 10.1007/BF00195083

Larsson C, Widell S, Kjellbom P (1987) Preparation of high-purity plasma membrane. *Methods In Enzymology*. 148: 558-568.

Mollet JC, Kim S, Jauh GY, Lord EM (2002) Arabinogalactan proteins, pollen tube growth, and the reversible effects of Yariv phenylglycoside. *Protoplasma*. 219:89-98. DOI: 10.1007/s007090200009

Pons A, Richet C, Robbe C, Herrmann A, Timmerman P, Huet G, Leroy Y, Carlstedt I, Capon C, Zanetta JP (2003) Sequential GC/MS analysis of sialic acids, monosaccharides, and amino acids of glycoproteins on a single sample as heptafluorobutyrate derivatives. *Biochemistry* 42:8342-8353. DOI [10.1021/bi034250e](https://doi.org/10.1021/bi034250e)

Roy S, Jauh GY, Helper PK, Lord EM (1998) Effects of Yariv phenylglycoside on cell wall assembly in the lily pollen tube. *Planta* 204:450-458. DOI 10.1007/s004250050279

Schultz C, Gilson P, Oxley D, Youl J, Bacic A (1998) GPI-anchors on arabinogalactan-proteins: implications for signaling in plants. *Trends in Plant Science* 3:426-431. DOI [10.1016/S1360-1385\(98\)01328-4](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(98)01328-4)

Sharom FJ, Radeva G (2004) GPI-anchored protein cleavage in the regulation of transmembrane signals. *Subcell Biochem* 37:285-315.

Sharom FJ, Lehto MT (2002) Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins: structure, function, and cleavage by phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Biochem Cell Biol* 80:535-549.

Showalter AM, Varner JE (1989) Plant hydroxyproline-rich Glycoprotein. *The Biochemistry of plant* 15:485-520.

Showalter AM (2001) Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. *Cell Mol Life Sci* 58:1399-1417.

Thompson HJM, Knox JP (1998) Stage-specific response of embryogenic carrot cell suspension cultures to arabinogalactan protein-binding β -glucosyl Yariv reagent. *Planta* 205:32-38. DOI 10.1007/s004250050293

Van Hengel AJ, Tadesse Z, Immerzeel P, Schols H, van Kammen A, de Vries SC (2001) N-acetylglucosamine and glucosamine-containing arabinogalactan proteins control somatic embryogenesis. *Plant Physiol.* 125:1880-1890.

Van Holst GJ, Clarke AE (1985) Quantification of arabinogalactan-protein in plant extracts by single radial gel diffusion. *Anal Biochem* 148:446-450. [DOI 10.1016/0003-2697\(85\)90251-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90251-9)

Willats WG, Knox JP (1996) A role for arabinogalactan-proteins in plant cell expansion: evidence from studies on the interaction of β -glucosyl Yariv reagent with seedling of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 9: 919-925. DOI 10.1046/j.1365-313X.1996.9060919.x

Yates EA, Valdor JF, Haslam SM, Morris HR, Dell A, Mackie W, Knox JP (1996) Characterization of carbohydrate structural features recognized by anti-arabinogalactan-protein monoclonal antibodies. *Glycobiology* 6:131-139.

Conclusion :

Dans cette partie, nous avons pu confirmer avec les génotypes Koospol que la quantité d'AGPs libérée dans le milieu de culture est en relation avec la capacité embryogène des différents génotypes, confirmant les résultats obtenus précédemment avec l'hybride 474, Flash et Pévèle. Ceci nous amène à proposer que le caractère embryogène présent dans l'espèce *intybus*, et plus particulièrement dans la variété-population Koospol, est associé avec la capacité à sécréter des AGPs au cours de l'embryogenèse somatique. Ainsi un seuil à 9 $\mu\text{g/ml}$ d'AGPs secrétées paraît nécessaire pour dire qu'un génotype soit embryogène. A l'inverse, un génotype non embryogène ne dépasse pas les 3 $\mu\text{g/ml}$.

Les expériences menées en présence du réactif β -D-Glc Yariv montrent une nette diminution des capacités embryogènes alors que les voies d'inductions (cellules en cours de réactivation et réactivées) et les autres voies d'expression le sont moins. Les AGPs, ou du moins leur libération dans le milieu de culture, seraient donc plus particulièrement liées à l'expression de la voie embryogène. Nous proposons l'hypothèse que ce phénomène de libération constitue un pré-requis à l'obtention des embryons somatiques.

L'étude de la libération des AGPs et de la cinétique de développement des embryons montre une similitude entre la sécrétion des AGPs et la première division des cellules embryogènes. De plus, lors de l'étude cytologique des tissus racinaires soumis aux différents inhibiteurs de phospholipases, aucune division n'est observée. L'emploi d'inhibiteurs de la PLC et des analyses biochimiques ont permis de mettre en évidence que la grande majorité des AGPs secrétées sont des protéines à ancre GPI.

L'immunolocalisation des AGPs ne nous a pas permis de mettre en évidence un épitope spécifique de la voie embryogène contrairement à ce que nous avons pu établir chez l'hybride interspécifique 474. Dans ce cas, il semble que son caractère hybride ne permet pas l'expression des patrons observés chez Koospol (*intybus*). Sachant que seule la voie embryogène ne s'exprime chez l'hybride « 474 », il était donc possible d'associer la présence de cet épitope à l'induction et à l'expression embryogène. Il semble donc que la régulation des AGPs soit plus complexe chez les génotypes Koospol, voire même que de nombreuses AGPs soient présents du fait de l'expression de 2 voies supplémentaires. La discrimination des structures embryogènes au compétentes à l'embryogenèse par l'immunolocalisation avec des JIM n'a donc pas réalisable sur notre modèle alors qu'elle est applicable dans une suspension de cellules embryogène de carotte (McCabe *et al.*, 1997).

Les western blot réalisés sur les AGPs secrétées issus de la culture de racines de K59 et K28 n'ont pas permis non plus de discriminer une classe spécifique. Cependant ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que les deux génotypes soient extrêmement proche génétiquement, mais aussi que le génotype K28 est peu embryogène et donc capable de libérer les mêmes AGPs que le génotype embryogène mais en quantité plus réduites.

The image features four purple flowers on green stems, arranged in a cross-like pattern. The flowers have multiple layers of thin, pointed petals. The background is a soft, light blue-grey gradient. The text 'CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES' is centered over the middle of the image in a bold, black, sans-serif font.

**CONCLUSIONS GENERALES ET
PERSPECTIVES**

Conclusions générales et perspectives

Les travaux réalisés sur différents génotypes de chicorées étudiés au laboratoire ont permis de mettre en évidence qu'il existe bien une corrélation entre la quantité d'AGPs sécrétées et la capacité embryogène de ces génotypes. Cette relation permet pour l'instant de distinguer les génotypes embryogènes des génotypes peu ou non embryogènes. Il serait intéressant de préciser cette relation en estimant si un nombre précis d'embryon peut être lié à une quantité déterminée d'AGPs.

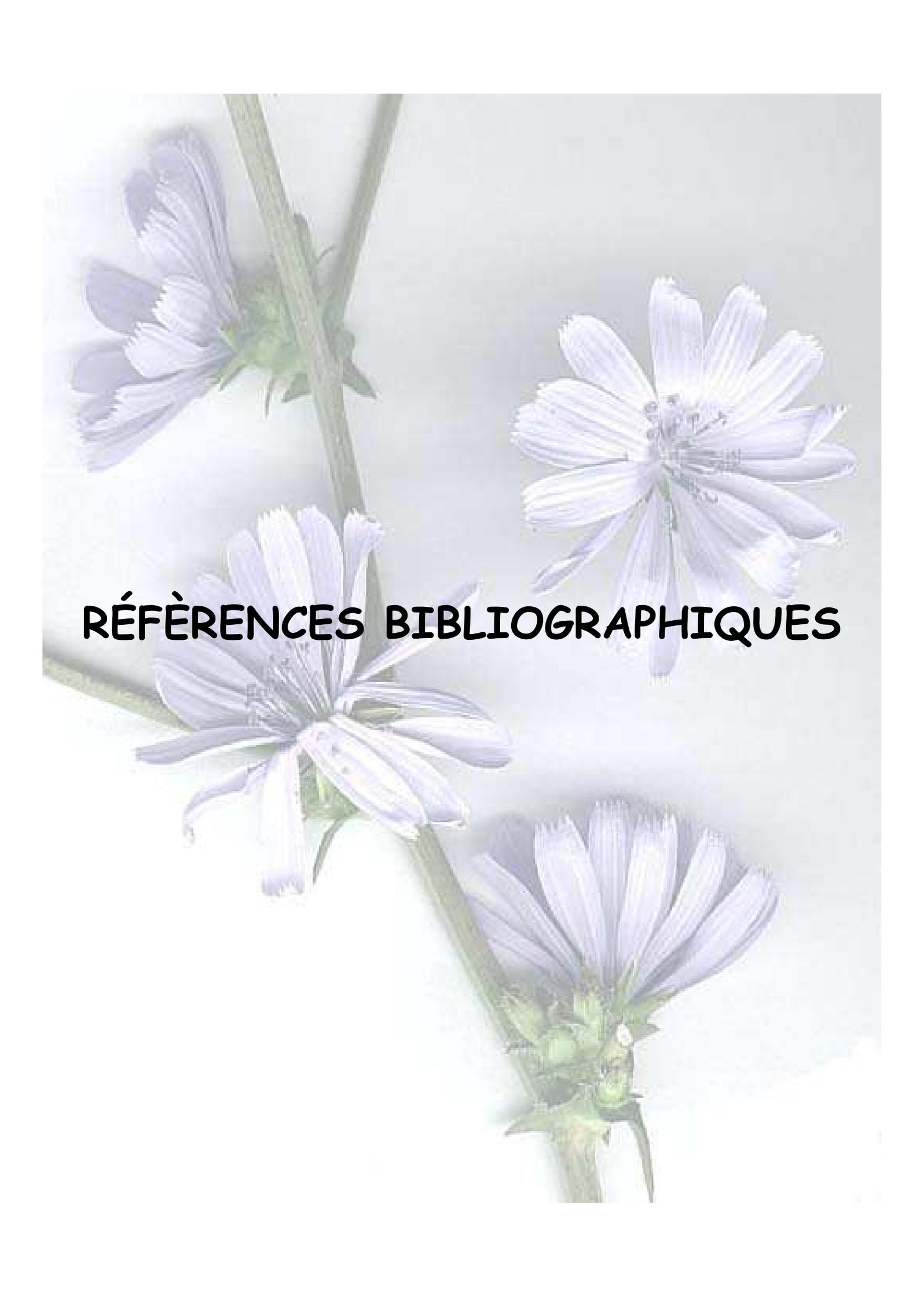
Pour la caractérisation et l'isolement des AGPs, les techniques employées n'ont pas abouti à l'identification d'une classe particulière d'AGPs, comme la présence de l'épitope JIM16 qui, dans les structures induites chez l'hybride « 474 » avait permis de discriminer les structures embryogènes uniquement. Toutefois cette discrimination ne se retrouve pas chez les génotypes kospol et notamment chez K59. Cette différence pourrait s'expliquer par l'apport génétique du patrimoine de l'espèce *endivia*, qui influencerait l'expression des AGPs, mais aussi sur le fait qu'il y a différentes voies d'expression morphogènes présentes chez Kospol. Ainsi, il sera nécessaire de sélectionner de nouveaux génotypes ne présentant qu'une seule voie d'expression, celle de l'embryogenèse somatique. Ceci est en cours d'analyse, grâce à l'autofécondation des génotypes K59 et K28, et l'obtention d'une descendance où pourrait s'opérer une ségrégation des différentes voies d'expression morphogènes.

Pour l'identification et la caractérisation des AGPs impliquées au cours de l'embryogenèse somatique, une nouvelle approche pourra être entreprise depuis l'identification par Sylvain Legrand de deux séquences potentielles d'AGPs issues de banques soustractives ADNc construites à partir d'individus embryogènes et

non embryogènes. L'obtention des séquences pleines longueurs sera nécessaire dans un premier temps pour valider l'existence d'AGPs à ancre GPI par identification du domaines C-ter hydrophobe et de la région consensus: w , $w+1$, $w+2$. D'autre part l'analyse de la séquence permettra de déterminer les sites potentielles de glycosylation et donc d'estimer le poids moléculaires de ces molécules. De plus l'utilisation des techniques de PCR quantitative et d'hybridations *in situ* permettrait de localiser et de déterminer le niveau d'expression des ces gènes et donc de connaître plus précisément le lieu, le temps et le niveau d'expression de ces AGPs au cours des phases précoces de l'embryogenèse.

Nous avons pu montrer que l'addition combinée de certains constituants des AGPs peut augmenter le nombre d'embryons produits. Concernant la proline, la littérature nous permet de penser qu'elle jouerait un rôle a la réponse au stress (Rhodes *et al.*, 1993 ; Heuer, 1994) et qu'elle pourrait être à l'origine de l'augmentation de la quantité de polyamines, comme chez les génotypes embryogènes chez *Cichorium* (Couillerot *et al.*, 1993). De telles polyamines pourraient stimuler les phospholipases (Echevarria-Machado *et al.*, 2004), et donc provoquer une libération des AGP-GPIs. Cette hypothèse restera à vérifier par l'étude de la production des polyamines et de l'activité de la phospholipase au cours de l'embryogenèse somatique de la chicorée. Le rôle des différents monosaccharides est ici plus confus. En effet, même s'il est établi que les AGPs peuvent être dégradées par différents complexes enzymatiques, dont les endochitinases, avec libération d'oligosaccharides, leurs fonctions et leurs modes d'actions dans l'embryogenèse somatique sont très peu étudiés. Une étude par immunomodulation avec des anticorps spécifiques de certains oligosaccharides et l'emploi d'oligosaccharides marqués pourraient contribuer a une meilleure compréhension de leurs fonctions.

Nous avons pu mettre en évidence que la sécrétion des AGPs est nécessaire au cours de l'embryogenèse somatique et plus particulièrement au cours de la phase d'expression de cette voie. L'implication des AGPs dans la voie d'expression pourrait se refléter dans la transduction de signal en particulier en relation avec la première division des cellules embryogènes. L'emploi du β -D-Glc Yariv et des inhibiteurs de phospholipase a permis de montrer une absence de division au niveau des structures embryogènes, si les AGPs ne sont pas sécrétées. L'ancre GPI pourrait également jouer un rôle important, certes en permettant la libération des AGPs et leur dégradation, mais aussi du fait que les protéines à ancre GPI sont trouvées dans des microdomaines. Par ailleurs, il est nécessaire aussi de considérer la libération d'autres composés comme le DAG et IPG. Cependant, les inhibiteurs employés dans notre étude inactivent l'ensemble des phospholipases et non spécifiquement celles responsables du clivage des protéines à ancre GPI. Ainsi, pour connaître le rôle de ces AGP-GPIs au cours de la phase d'expression et leur rôle potentiel dans la division des cellules réactivées, une approche consisterait à étudier la structure de l'ancre GPI des AGPs et l'action de leurs dérivés après clivage de l'ancre.

The image features four light purple flowers with multiple petals, arranged on green stems against a light, slightly textured background. The flowers are positioned in the upper left, upper right, lower left, and lower right areas. The text 'RÉFÈRENCES BIBLIOGRAPHIQUES' is centered over the image in a bold, black, sans-serif font.

RÉFÈNCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Anderson R.G.W. Caveolae: where incoming and outgoing messengers meet. 1993. Proc Natl Sci USA. 90: 10909-10913.

Alban S., Classen B., Brunner G., Blaschek W. Differentiation between the complement modulating effects of an arabinogalactan-protein from *Echinacea purpurea* and heparin. 2002. Planta Med. 68: 1118-1124.

Aldington S., Fry S.C. Oligosaccharins. 1993. Adv Bot Res. 19: 1-101.

Armstrong C.L., Green C.E. Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. 1985. Planta. 164: 207-214.

B

Bacic A., Currie G., Gilson P., Mau S.L., Oxley D., Schultz C., Sommer-Knudsen J., Clarke A.E. Structural classes of arabinogalactan-proteins. 2000. In Cell and developmental biology of arabinogalactan proteins edited by Nothnagel et al, Kluwer Academic/Plenum Publisher.

Baggot J.D., Love D.N., Rose R.J., Raus J. The pharmacokinetics of some aminoglycoside antibiotics in the horse. 1981. J Vet Pharmacol Ther. 4: 277-84.

Baldwin T.C., MacCann M.C., Roberts K. A novel hydroxyproline-deficient arabinogalactan protein secreted by suspension-cultured cells of *Daucus carota*. 1993. Plant Physiol. 103: 115-123.

Bellettre A., Couillerot J.P., Vasseur J. Effect of glycérol on somatic embryogenesis in *Cichorium* leaves. 1999. Plant Cell Rep. 19: 26-31.

Bidlingmeyer B.A., Cohen S.A., Tarvin T.L. Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. 1984. J Chromatogr. 336: 93-104.

Blervacq A-S., Dubois J., Hilbert J-L., Vasseur J. Effects of caffeine on somatic embryogenesis induction and expression in leaves of a *Cichorium* hybrid. 1995. Plant Physiology and Biochemistry. 33: 741-749.

Blum H., Beier H., Gross H.J. Improved Silver Staining of Plant Proteins, RNA and DNA in Polyacrylamide Gels. 1987. Electrophoresis. 8: 93-99.

Blöchl A., Grenier-de March G., Sourdioux M., Peterbauer T., Richter A. Induction of raffinose oligosaccharide biosynthesis by abscisic acid in somatic embryos of alfalfa (*Medicago sativa* L.). 2005. Plant Science. 168: 1075-1082.

Bolwell G.P., Dixon R.A. Membrane-bound hydroxylases in elicitor-treated bean cells. Rapid induction of the synthesis of prolyl hydroxylase and a putative cytochrome P-450. **1986.** Eur J Biochem. 159: 163-169.

Borner G.H.H., Stevens T., Lilley K.S., Dupree P. The role of GPI-anchored cell surface proteins in Arabidopsis. **2001.** In 9th International Cell Wall Meeting, Toulouse, pp 74.

Borner G.H.H., Sherrier D.J., Stevens T.J., Arkin I.T., Dupree P. Prediction of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in Arabidopsis. **2002.** Plant Physiol. 129: 486-499.

Boudet A.M. Lignins and lignification: Selected issues. **2000.** Plant Physiology and Biochemistry. 38: 81-96.

Bronner R., Jeannin G., Hahne G. Early cellular events during organogenesis and somatic embryogenesis induced on immature zygotic embryos of sunflower (*Helianthus annuus*). **1994.** Can J Bot. 72: 239-249.

Brown Jr R.M., Saxena I.M., Kudlicka K. Cellulose biosynthesis in higher plants. **1996.** Trends in Plant Science. 1: 149-156.

Brown Jr R.M., Saxena I.M. Cellulose biosynthesis: A model for understanding the assembly of biopolymers. **2000.** Plant Physiol Biochem. 38: 57-67.

Brownlee C. Role of the extracellular matrix in cell-cell signalling: paracrine paradigms. **2002.** Curr Opin Plant Biol. 5: 396-401.

Busch M., Mayer U., Jurgens G. Molecular analysis of the Arabidopsis pattern formation of gene GNOM: gene structure and intragenic complementation. **1996.** Mol Gen Genet. 250: 681-91.

C

Cailloux F., Julien-Guerrier J., Linossier L., Coudret A. Long-term somatic embryogenesis and maturation of somatic embryos in *Hevea brasiliensis*. **1996.** Plant Science. Volume 120: 185-196.

Carpita N.C., Gibeaut D.M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **1993.** Plant J. 1: 1-30.

Cary L. A., Cooper J. A. Molecular switches in lipid rafts. **2000.** Nature. 404: 945-947.

Cassab G.I., Varner J.E. Cell wall proteins. **1988.** Annu Rev Plant Physiol. 39: 321-353.

Chapman A., Blervacq A.S., Tissier J.P., Delbreuil B., Vasseur J., Hilbert J. L. Cell wall differentiation during early somatic embryogenesis in plant: I. Scanning and transmission originating from direct, indirect, and adventitious pathways. **2000a.** Can J Bot. 78: 816-823.

Chapman A., Blervacq A.S., Hendriks T., Slomianny C., Vasseur J., Huilbert J.L. Cell wall differentiation during early somatic embryogenesis in plants: II. Ultrastructural study and pectin immunolocalization on chicory embryos. 2000b. Can J Bot. 78: 1-8.

Chapman A., Blervacq A.S., Vasseur J., Hilbert J.L. Arabinogalactan-proteins in Cichorium somatic embryogenesis: effect of beta-glucosyl Yariv reagent and epitope localisation during embryo development. 2000c. Planta. 211: 305-314.

Chatthai M., Kaukinen K.H., Tranbarger T.J., Gupa P.K., Misra S. The isolation of a novel methallothionein-related cDNA expressed in somatic and zygotic embryos of Douglas-fir: regulation by ABA, osmoticum, and metal ion. 1997. Plant Mol Biol. 34: 243-254.

Chaves I., Regalado A.P., Chen M., Ricardo C.P., Showalter A.M. Programmed cell death induced by (β -D-galactosyl)³ Yariv reagent in *Nicotiana tabacum* BY-2 suspension-cultured cells. 2002. Physiologia Plantarum. 116: 548-553.

Chen C.G., Pu Z.Y., Moritz R.L., Simpson R.J., Bacic A., Clarke A.E., Mau S.L. Molecular cloning of a gene encoding an arabinogalactan-protein from pear (*Pyrus communis*) cell suspension culture. 1994. Proc Natl Acad Sci USA. 91: 10305-10309.

Chen C.G., Mau S.L., Clarke A.E. Nucleotide sequence and style-specific expression of a novel proline-rich protein gene from *Nicotiana glauca*. 1993. Plant Mol Biol. 21: 391-395.

Clark J. K., Sheridan W. F. Isolation and Characterization of 51 embryo-specific Mutations of Maize. 1991. Plant Cell. 9: 935-951.

Cosgrove D. Enzymes and others agents that enhance cell wall extensibility. 1999. Annu Rev Plant Physiol Mol Biol. 50: 391-417.

Coté F., Hahn M.G. Oligosaccharins: structures and signal transduction. 1994. Plant Mol Biol. 26: 1379-1411.

Couillerot J.P., Decout E., Warnot F., Dubois J., VASSEUR J. Evolution des polyamines libres en relation avec la source carbonée et l'embryogenèse somatique chez un *Cichorium* hybride. 1993. C.R. Acad. Sci. 316: 299-305.

Cresti M., Blackmore S., van Went J.L. Atlas of sexual reproduction in flowering plants. 1992. Springer Verlag, Berlin.

D

Darjania L., Ichise N., Ichikawa S., Okamoto T., Okuyama H., Thompson G.A. Dynamic turnover of arabinogalactan proteins in cultured *Arabidopsis* cells. 2002. Plant Physiol Biochem. 40: 69-79.

Dahmer M.L., Hilderand D.F., Collins G.B. Comparative protein accumulation patterns in soybeans somatic and zygotic embryos. 1992. In Vitro Cell Dev Biol. 28: 106-114.

- Darvill A., Augur C., Bergmann C., Carlson R.W., Cheong J.J., Eberhard S., Hahn M.G., Lo V.M., Marfa V., Meyer B. Oligosaccharins--oligosaccharides that regulate growth, development and defence responses in plants. 1992. Glycobiology. 2: 181-198.
- Décout E., Dubois T., Guedira M., Dubois J., Audran J.C., Vasseur J. Role of temperature as triggering signal for organogenesis or somatic embryogenesis in wounded leaves of chicory cultured *in vitro*. 1994. J Exp Bot. 45: 1859-1865.
- De Jong A.J., Schmidt E.D., de Vries S.C. Early events in higher-plant embryogenesis. 1993. Plant Mol Biol. 22: 367-77.
- De Jong A.J., Cordewener J., Lo Schiavo F., Terzi M., Vandekerckove J., Van Kammen A., De Vries S.C. A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase. 1992. The Plant Cell. 4: 425-433.
- Deldique B., Couillerot J.P., Doisy C., Vasseur J. Effects of polyamine treatment on somatic embryogenesis in a *Chicorium* hybride and on intra and extracellular polyamine content. 1995. Colloque 8ème entretiens Centre Jacques Cartier "De la plante à la graine". Lyon 5-8 déc.
- Diallo D., Paulsen B.S., Liljeback T.H., Michaelsen T.E. Polysaccharides from the roots of *Entada africana* Guill. et Perr., Mimosaceae, with complement fixing activity. 2001. J Ethnopharmacol. 74: 159-171.
- Dijak M., Smith D.L., Wilson T.J., Brown D.C.W. Stimulation of direct embryogenesis from mesophyll protoplasts of *Medicago sativa*. 1986. Plant Cell Reports. 5: 468-470.
- Dijak M., Simmonds D.H. Microtubule organization during early direct embryogenesis from mesophyll protoplasts of *Medicago sativa*. 1988. Plant Sci. 5: 468-470.
- Ding L., Zhu J.K. A role for arabinogalactan-proteins in root epidermal cell expansion. 1997. Planta. 203: 289-294.
- Dodeman V.L., Ducreux G., Kreis M. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. 1997. Journal of experimental botany. 48: 1493-1509.
- Domon J.M., Neutelings G., Roger D., David A., David H. A basic Chitinase-like protein secreted by embryogenic tissues of *Pinus carbaea* acts on arabinogalactan proteins extracted from the same cell lines. 2000. Journal Plant Physiol. 156: 33-39.
- Dos Santos A.P., Cutter E.G., Davey M.R. Origin and development of somatic embryos in *Medicago sativa* L. (*alfafa*). 1983. Protoplasma. 117: 107-115.
- Driouich A., Faye L., Staehelin L. A. The plant Golgi apparatus: a factory for complex polysaccharides and glycoproteins. 1993. Trends Biochem Sci. 18: 210-214.
- Droillard M.J., Rouet-Mayer M.A., Bureau J.M., Lauriere C. Membrane-Associated and Soluble Lipoxxygenase Isoforms in Tomato Pericarp (Characterization and Involvement in Membrane Alterations). 1993. Plant Physiol. 103: 1211-1219.

Du H., Simpson R.J., Moritz R.L., Clarke A.E., Bacic A. Isolation of the protein backbone of an arabinogalactan-protein from the style of *Nicotiana glauca* and characterization of a corresponding cDNA. 1994. Plant Cell. 6: 1643-1653.

Dubois T., Dubois J., Guerida M., Vasseur J. Embryogenèse somatique directe sur les styles de *Cichorium*: effets de la température et origine des embryoides. 1988. C R Acad Sci Paris. 307: 669-675.

Dubois T., Guerida M., Dubois J., Vasseur J. Direct somatic embryogenesis in leaves of *Cichorium*: is callose an early marker?. 1990. Ann Bot. 65: 539-545.

Dubois T., Guerida M., Dubois J., Vasseur J. Direct somatic embryogenesis in leaves of *Cichorium*. A histological and SEM study of early stages. 1991. Protoplasma. 162: 120-127.

Duijs J.G., Voorrips R.E., Visser D.L., Custers J.B.M. Microspore culture is successful in most crop type of *Brassica oleracea* L. 1992. Euphytica. 60: 45-55.

Dyachok J.V., Wiweger M., Kenne L., von Arnold S. Endogenous Nod-factor-like signal molecules promote early somatic embryo development in Norway spruce. 2002. Plant Physiol. 128: 523-533.

Dyachok J.V., Tobin A.E., Price N.P.J., von Arnold, S. Rhizobial Nod factors stimulate somatic embryo development in *Picea abies*. 2000. Plant Cell Report. 19: 290-297.

E

Echevarria-machado I., Ku-Gonzalez A., Loyola-Vargas V.M., Hernandez-Sotomayor S.M.T. Interaction of spermine with a signal transduction pathway involving phospholipase C, during the growth of *Cathanthus roseus* transformed roots. 2004. Physiologia Plantarum. 120: 140-151.

Eisenhaber B., Bork P., Eisenhaber F. Post-translational GPI lipid anchor modification of proteins in kingdoms of life: analysis of protein sequence data from complete genomes. 2001. Protein Eng. 14: 17-25.

Eisenhaber B., Wildpaner M., Schultz C.J., Borner G.H.H., Dupree P., Eisenhaber F. Glycosylphosphatidylinositol Lipid Anchoring of Plant Proteins. Sensitive Prediction from Sequence- and Genome-Wide Studies for Arabidopsis and Rice. 2003. Plant Physiology. 133: 1691-1701

Egertsdotter U., von Arnold S. Importance of arabinogalactan proteins for the development of somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies*). 1995. Physiologia Plantarum. 95: 334-345.

Elkins T., Hortsch M., Bieber A.J., Snow P.M., Goodman C.S. Drosophila fasciclin I is a novel homophilic adhesion molecule that along with fasciclin III can mediate cell sorting. 1990. J Cell Biol. 110: 1825-1832.

Emons A.M.C., samallo-Droppers A., Van der Toorn C. The influence of sucrose, mannitol, L-proline, abscissic acid and gibberellic acid on the maturation of somatic embryos of maize from suspension cultures. **1993.** J Plant Physiol. 142: 597-604.

Emons A.M.C., Vos J.W., Kieft H. A freeze fracture analysis of the surface of embryogenic and non-embryogenic suspension cells of *Daucus carota*. **1992.** Plant Sci. 87: 85-97.

Errampalli D., Patton D., Castle L., Mickelson L., Hansen K., Schnall J., Feldmann K., Meinke D. Embryonic Lethals and T-DNA Insertional Mutagenesis in Arabidopsis. **1991.** Plant Cell. 3: 149-157.

F

Filho J.C.B., Hattori K. Embryogenic callus formation and histological studies from *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni floret explants. **1997.** R Bras Fisiol Veg. 9: 185-188.

Filonova L.H., Bozhkov P.V., von Arnold S. Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking. **2000.** J Exp Bot. 51: 249-64.

Fincher G.B., Stone B.A. Arabinogalactan-proteins: Structure, Biosynthesis, and Function. **1983.** Ann Rev Plant Physiol. 34: 47-70.

Fowke L.C., Attree S.M., Wang H. Dunstan D.I. Microtubule organisation and cell division in embryogenic protoplast cultures of white spruce (*Picea glauca*). **1990.** Protoplasma. 158: 86-94.

Fry S.C. Polysaccharides-modifying enzymes in plant cell wall. **1995.** Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol. 46: 497-520.

Fry S.C., Aldington S., Hetherington P.R., Aitken J. Oligosaccharides as signals and substrates in the plant cell wall. **1993.** Plant Physiol. 103: 1-5.

G

Gane, A.M., Craik D., Munro S.L., Howlett G.J., Clarke A.E., Bacic A. Structural analysis of the carbohydrate moiety of arabinogalactan-proteins from stigmas and styles of *Nicotiana glauca*. **1995.** Carbohydr Res. 277: 67-85.

Gao M., Showalter A.M. Immunolocalization of LeAGP-1, a modular arabinogalactan-protein, reveals its developmentally regulated expression in tomato. **2000.** Planta. 210: 865-874.

Gao M., Showalter A.M. Yariv reagent treatment induces programmed cell death in Arabidopsis cell cultures and implicates arabinogalactan protein involvement. **1999.** Plant J. 19: 321-331.

Gaspar Y., Schutz C., Gilson P., Gelvin S., Nam J., Bacic A. A classical arabinogalactan protein mutant from *Arabidopsis*. **2001a.** 9th International Congress on Plant Cell Wall, 2-7 September, Toulouse (France), p66.

Gaspar Y., Johnson K.L., McKenna J.A., Bacic A., Schultz C. The complex structures of arabinogalactan-proteins and the journey towards understanding functions. **2001b.** Plant Mol Biol. 47: 161-176.

Gavish H., Vardi A., Fluhr R. Extracellular proteins and early embryo development in *Citrus* nucellar cell cultures. **1991.** Physiol Plant. 82: 606-616.

Gerster J., Allard S., Robert L.S. Molecular characterization of two Brassica napus pollen-expressed genes. **1996.** Plant Physiol. 110: 1231-1237.

Giuliano G., Lo Schiavo F., Terzi M. Isolation and developmental characterization of temperature sensitive carrot cell variants. **1984.** Theor Appl Genet. 67: 179-183.

Guerida M., Buboïs-Tylski T., Vasseur J., Dubois J. Embryogenèse somatique directe à partir de culture d'anthères du *Cichorium* (Asteraceae). **1989.** Can J Bot. 67: 970-976.

Guerida M., Dubois T., Dubois J., Vasseur J. Influence du saccharose sur le rendement, la morphologie et le développement des embryons somatiques chez *Cichorium*. **1990.** C R Acad Sci Paris. 310: 453-459.

H

Hakman I., Stabel P., Engstrom P., Eriksson T. Storage protein accumulation during zygotic and somatic embryo development in *Picea abies* (Norway spruce). **1990.** Physiol Plant. 80: 441.

Helleboid S., Hendriks T., Bauw G., Inze D., Vasseur J., Hilbert J.L. Three major somatic embryogenesis related proteins in *Cichorium* identified as PR proteins. **2000.** J Exp Bot. 51: 1189-2000.

Helleboid S., Bauw G., Belingheri L., Vasseur J., Hilbert J.L. Extracellular beta-1,3-glucanases are induced during early somatic embryogenesis in *Cichorium*. **1998.** Planta. 205: 56-63.

Heller R. Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés *in vitro*. **1953.** Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Veg. 14: 1-223.

Herman E.M., Lamb C.J. Arabinogalactan-rich glycoprotein are localized on the cell surface and in intravacuolar multivesicular bodies. **1992.** Plant Physiol. 98: 264-272.

Heuer B. Osmoregulatory role of proline in water and salt-stressed plants. **1994.** in M Pessaraki (Eds.), Handbook of Plant and Crop Stress, Marcel Dekker, New York. 363-381.

Ho W.J., Vassil J.K. Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) I. The morphology and physiology of callus formation and the ontogeny of somatic embryos. **1993.** Protoplasma. 118: 169-180.

Hong Y., Maeda Y., Watanabe R., Inoue N., Ohishi K., Kinoshita T. Requirement of PIG-F and PIG-O for transferring phosphoethanolamine to the third mannose in glycosylphosphatidylinositol. **2000.** J Biol Chem. 275:20911-20919.

J

Janisch K., Schempp H. Evaluation of the oxidative burst in suspension cell culture of *Phaseolus vulgaris*. 2004. Z Naturforsch. 59: 849-855.

Jones T.J., Rost T.L. The developmental anatomy and ultrastructure of somatic embryos from rice (*Oryza sativum* L.) scutellum epithelial cells. 1989. Bot Gaz. 150: 41-49.

Joy R.W., Yeung E.C., Kong L., Thorpe T.A. Development of white spruce somatic embryos: I. Storage product deposition. 1991. In Vitro Cell Dev Biol. 270: 32.

K

Kawaguchi K., Shibuya N., Ishii T. A novel tetrasaccharide, with a structure similar to the terminal sequence of an arabinogalactan-protein, accumulates in rice anthers in a stage-specific manner. 1996. Plant J. 9: 777-785.

Kevei Z., Vinardell J.M., Kiss G.B., Kondorosi A., Kondorosi E. Glycine-rich proteins encoded by a nodule-specific gene family are implicated in different stages of symbiotic nodule development in *Medicago* spp. 2002. Mol Plant Microbe Interact. 15: 922-931.

Kieliszewski M.J., Kamyab A., Leykam J.F., Lamport D.T. A Histidine-rich extensin from *Zea mays* is an arabinogalactan protein. 1992b. Plant Physiol. 99: 538-547.

Kieliszewski M.J., Lamport D.T. Extensin: repetitive motifs, functional sites, post-translational codes, and phylogeny. 1994. The Plant Journal. 5: 157-172.

Kikuchi S., Ohinata A., Tsumuraya Y., Hashimoto Y., Kaneto Y., Matsushima H. Production and characterization of antibodies to the β -(1,6)-galactotetraosyl group and their interaction with arabinogalactan-proteins. 1993. Planta. 190: 525-535.

Kinoshita T., Ohishi K., Takeda J. GPI-anchor synthesis in mammalian cells: genes, their products, and a deficiency. 1997. J Biochem (Tokyo). 122: 251-257.

Kinoshita T., Inoue N. Dissecting and manipulating the pathway for glycosylphosphatidylinositol-anchor biosynthesis. 2000. Curr Opin Chem Biol. 4:632-638.

Kitano H., Tamura Y., Satoh H., Nagato Y. Hierarchical regulation of organ differentiation during embryogenesis in rice. 1993. Plant J. 9: 607-610.

Kjellbom P., Snogerup L., Stöhr C., Reuzeau C., McCabe P.F., Pennell R.I. Oxidative-cross linking of plasma membrane arabinogalactan-proteins. 1997. Plant J. 12: 118-119.

Knox J.P. Cell adhesion, cell separation and plant morphogenesis. 1992. The Plant Journal. 2: 137-141.

Knox J.P., Linstead P.J., Peart J., Cooper C., Roberts K. Developmentally-regulated epitopes of cell surface arabinogalactan-proteins and their relation to root tissue pattern formation. 1991. Plant Journal. 1: 317-326.

Kreuger M., van Holst G.J. Arabinogalactan proteins and plant differentiation. 1996. Plant Mol Biol. 30: 1077-1086.

Kreuger M., Vanholst G.J. Arabinogalactan-protein epitopes in somatic embryogenesis of *Daucus carota* L. 1995. Planta. 197: 135-141.

Kristensen M.M.H., Find J.I., Floto F., Moller J.D., Norgaard J.D., Krogstrup P. The origin and the development of somatic embryos following cryopreservation of an embryogenic suspension culture of *Picea abies sitchensis*. 1994. Protoplasma. 182: 65-70.

L

Laparra H., Bronner R., Hahne G. Histological analysis of somatic embryogenesis induced in leaf explants of *Helianthus smithii* Heiser. 1997. Protoplasma. 196: 1-11.

Larsson C., Widell S., Kjellbom P. Preparation of high-purity plasma membrane. 1987. Methods In Enzymology. 148: 558-568.

Lemieux B. Molecular genetics of epicuticular wax biosynthesis. 1996. Trends in Plant Science. 1: 312-318.

Li S.X., Showalter A.M. Cloning and developmental/stress-regulated expression of a gene encoding a tomato arabinogalactan protein. 1996. Plant Mol Biol. 32: 641-652.

Limani A., Roux L., Laviile J., Roux Y. Dynamics of nitrogen compounds in the chicory (*Cichorium intybus* L.) tuberised tap root during season and cold storage period. 1993. Plant physiol. 106: 477-484.

Lindstrom J.T., Vodkin L.O. A soybean cell wall protein is affected by seed color genotype. 1991. Plant Cell. 3: 561-571.

Loopstra C.A., Puryear J.D., No E.G. Purification and cloning of an arabinogalactan-protein from xylem of loblolly pine. 2000. Planta. 210: 686-689.

Lou H., Kako S. Role of high sugar concentrations in inducing somatic embryogenesis from cucumber cotyledons. 1995. Scientia Horticulturae. 64:11-20.

Lu H., Chen M., Showalter A.M. Developmental expression and perturbation of arabinogalactan-proteins. 2001. Physiol Plant. 112: 442-450.

M

Macchiavelli R.E., Brelles-Marino G. Nod factor-treated *Medicago truncatula* roots and seeds show an increased number of nodules when inoculated with a limiting population of *Sinorhizobium meliloti*. 2004. J Exp Bot. 55: 2635-2640.

Maheswaran G., Williams E.G. Origin and development of somatic embryos formed directly on immature embryos of *Trifolium repens in vitro*. 1985. Annals of Botany. 56:619-630.

Majewska-Sawka A., Nothnagel E.A. The multiple roles of arabinogalactan proteins in plant development. 2000. Plant Physiol. 122: 3-10.

Malinowski R., Filipecki M. The role of cell wall in plant embryogenesis. 2002. Cell Mol Biol Lett. 7: 1137-51.

Mau S.I., Chen C.G., Pu Z.Y., Moritz R.L., Simpson R.J., Bacic A., Clarke A.E. Molecular cloning of cDNAs encoding the protein backbones of arabinogalactan-proteins from the filtrate of suspension-cultured cells of *Pyrus communis* and *Nicotiana glauca*. 1995. Plant J. 8: 269-281.

Michaux-Ferrière N., Grout H., Carron M.P. Origin and ontogenesis of somatic embryos in *Hevea brasiliensis* (Euphorbiaceae). 1992. Am J Bot. 79: 174-180.

Miller J.C., Fry S.C. Production and harvesting of ionically wall-bound extensin from living cell expansion cultures. 1992. Plant Cell Tiss Cult. 31: 61-66.

Mollet J.C., Kim S., Jauh G.Y., Lord E.M. Arabinogalactan proteins, pollen tube growth, and the reversible effects of Yariv phenylglycoside. 2002. Protoplasma. 219: 89-98.

Moreews F. Effets de préconditionnements des plantes de *Cichorium* sur l'embryogenèse somatique. 1998. DEA Université des Sciences et Technologies de LILLE.

Moreews F., Windels D, Blervacq A.S., Couillerot J.P., Batel L., Hilbert J.L. Effects of plant pretreatments on somatic embryogenesis in embryogenic and recalcitrant *Cichorium* cultivars, I. Characterisation of pre-treatment. (En préparation pour Plant Physiol Bioch).

Morel G., Wetmore R.H. Fern callus tissue culture. 1951. Amer J Bot. 38: 141-143.

Motose H., Sugiyama M., Fukuda H. An arabinogalactan protein(s) is a key component of a fraction that mediates local intercellular communication involved in tracheary element differentiation of zinnia mesophyll cells. 2001. Plant Cell Physiol. 42: 129-137.

Moustacas, A.M., Nari J., Borel M., Noat G., Ricard J. Pectin methylesterase, metal ions and plant cell-wall extension. The role of metal ions in plant cell-wall extension. 1991. Biochem J. 279: 351-354.

Mulder M.M., Emons A.M.C. Cell wall development in maize somatic embryos studied by protolysis mass spectrometry. 1993. J of Analytical and Applied Pyrolysis. 25: 255-264.

Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. 1962. Physiol Plant. 15: 473-497.

N

Nazih F., Delbart C. Transmission du signal intracellulaire par les protéines ancrées par un glycosyl-phosphatidylinositol. 1998. Médecine sciences. 14 :275-282.

Nomura K., Komamine A. Identification and isolation of single cells that produce somatic embryos at a high frequency in a carrot suspension culture. **1985.** Plant Physiol. 79: 988-991.

Norman P.M., Kjellbom P., Bradley D.J., Hahn M.G., Lamb C.J. Immunoaffinity purification and biochemical characterization of plasma-membrane arabinogalactan rich glycoproteins of *Nicotiana glutinosa*. **1990.** Planta. 181: 365-373.

Nothnagel E.A. Proteoglycans and related components in plant cells. **1997.** Int Rev Cytol. 174: 195-291.

O

Ohishi K., Inoue N., Maeda Y., Takeda J., Riezman H., Kinoshita T. Gaa1p and gpi8p are components of a glycosylphosphatidylinositol (GPI) transamidase that mediates attachment of GPI to proteins. **2000.** Mol Biol Cell. 11:1523-1533.

Osman M.E., Menzies A.R., Martin B.A., Williams P.A., Phillips G.O., Baldwin T.C. Characterization of gum arabic fractions obtained by anion-exchange chromatography. **1995.** Phytochemistry. 38: 409-417.

P

Passarinho P.A., Van Hengel A.J., Frans, P.F., de Vries S.C. Expression pattern of the *Arabidopsis thaliana* AtEP3/AtchitIV endochitinase gene. **2001.** Planta. 212: 556-567.

Pear J.R., Kawagoe Y., Schreckengost W.E., Delmer D.P., Stalker D.M. Higher plants contain homologs of the bacterial *celA* genes encoding the catalytic subunit of cellulose synthase. **1996.** Proc Natl Acad Sci USA. 93: 12637-12642.

Peles E., Nativ M., Lustig M., Grumet M., Schilling J., Martinez R., Plowman G.D., Schlessinger J. Identification of a novel contactin-associated transmembrane receptor with multiple domains implicated in protein-protein interactions. **1997.** Embo J. 16: 978-988.

Pennell R.I., Knox J.P., Scofield G.N., Selvendran R.R., Roberts K. A family of abundant plasma membrane-associated glycoproteins related to the arabinogalactan proteins is unique to flowering plants. **1989.** J Cell Biol. 108: 1967-1977.

Pennell R.I., Roberts K. Sexual development in the pea is presaged by altered expression of arabinogalactan protein. **1990.** Nature. 344: 547-549.

Pennell R.I., Janniche L., Kjellbom P., Scofield G.N., Peart J.M., Roberts K. Developmental Regulation of a Plasma Membrane Arabinogalactan Protein Epitope in Oilseed Rape Flowers. **1991.** Plant Cell. 3: 1317-1326.

Perez-Grau L., Golberg R.B. Soybean seed protein genes are regulated spatially during embryogenesis. **1989.** The Plant Cell. 1: 1095-1109.

Pons A., Richet C., Robbe C., Herrmann A., Timmerman P., Huet G., Leroy Y., Carlstedt I., Capon C., Zanetta J.P. Sequential GC/MS analysis of sialic acids, monosaccharides, and amino acids of glycoproteins on a single sample as heptafluorobutyrate derivatives. 2003. Biochemistry. 42: 8342-8353.

Post-Beittenmiller D. Biochemistry and molecular biology of wax production in plants. 1996. Standard.dtl Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 47: 405-430.

Puigderrajols P., Mir G., Molinas M. Ultrastructure of Early Secondary Embryogenesis by Multicellular and Unicellular Pathways in Cork Oak (*Quercus suber* L.). 2001. Annals of Botany. 87: 179-189.

Pullman G.S., Gupta P.K., Timmis R., Carpenter C., Kreitinger M., Welty E. Improved Norway spruce somatic embryo development through the use of abscisic acid combined with activated carbon. 2005. Plant Cell Rep. Springer-Verlag.

Q

Qi W., Fong C., Lamport D.T.A. Gum arabic glycoprotein is a twister hairy rope. 1991. Plant Physiol. 96: 848-855.

Quatrano R.S., Shaw S.L. Role of the cell wall in the determination of cell polarity and the plane of cell division in *Fucus* embryos. 1997. Trends in Plant Science. 2: 15-21.

R

Ralph J., Hatfield R.D., Piquemal J., Yahiaoui N., Pean M., Lapierre C., Boudet A.M. NMR characterization of altered lignins extracted from tobacco plants down-regulated for lignification enzymes cinnamylalcohol dehydrogenase and cinnamoyl-CoA reductase. 1998. Proc Natl Acad Sci USA. 95: 12803-12808.

Rhodes C.A., Green C.E., Phillips R.L. Factors affecting tissue culture initiation from maize tassels. 1986. Plant Sci. 46: 225-232.

Rhodes D., Hanson A.D. Quarternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. 1993. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol. 44: 357-384.

Ringli C., Keller B., Ryser U. Glycine-rich proteins as structural components of plant cell walls. 2001. Cell Mol Life Sci. 58: 1430-1441.

Robatche-Claive A.S. Essai de synchronisation de l'Embryogenèse somatique directe à partir de feuilles du *Cichorium* hybride « 474 » : synchronisation de l'induction. 1991. DEA Université de technologies de Compiègne.

Robatche-Claive A.S., Couillerot J.P., Dubois J., Dubois T., Vaseeur J. Embryogenèse somatique directe dans les feuilles du *Cichorium* hybride « 474 » : synchronisation de l'induction. 1992. C R Acad Sci Paris. 314: 371-377.

Roy S., Jauh G.Y., Hepler P.K., Lord E.M. Effects of Yariv phenylglycoside on cell wall assembly in the lily pollen. **1998.** Planta. 204: 450-458.

Russell S.D. The Egg Cell: Development and role in fertilization and early embryogenesis. **1993.** The Plant Cell. 5: 1349-1359.

Ryser U. Protoxylem: the deposition of a network containing glycine-rich cell wall proteins starts in the cell corners in close association with the pectins of the middle lamella. **2003.** Planta. 216: 854-864.

S

Sachetto-Martins G., Franco L.O., de Oliveira D.E. Plant glycine-rich proteins: a family or just proteins with a common motif ?. **2000.** Biochimica Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression. 1492: 1-14.

Schindler T., Bergfeld R., Schopfer P. Arabinogalactan proteins in maize coleoptiles: developmental relationship. **1995.** Plant J. 7: 25-36.

Schlessinger J., Lax I., Lemmon M. Regulation of growth factor activation by proteoglycans: what is the role of the low affinity receptors? **1995.** Cell. 83: 357-360.

Schroeder R., London E., Brown D.A. Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins: GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behaviour. **1994.** Proc Natl Acad Sci USA. 91: 12130-12134.

Schultz C., Gilson P., Oxley D., Youl J., Bacic A. GPI-anchor on arabinogalactan-proteins: implications for signalling in plants. **1998.** Trends in plant science. 3: 426-431.

Schultz C.J., Johnson K.L., Currie G., Bacic A. The classical arabinogalactan protein gene family of arabidopsis. **2000.** Plant Cell. 12: 1751-1768.

Schultz C.J., Rumsewicz M.P., Johnson K.L., Jones B.J., Gaspar Y.M., Bacic A. Using genomic resources to guide research directions. The arabinogalactan protein gene family as a test case. **2002.** Plant Physiol. 129: 1448-1463.

Sechley K.E., Oaks A., Bewley J.D. Enzymes of nitrogen assimilation undergo seasonal fluctuation in the roots of the persistent weedy perennial *Cichorium intybus*. **1991.** Plant Physiol. 97: 322-329.

Serpe M.D., Nothnagel E.A. Effect of Yariv phenylglycosides on *Rosa* cell suspensions: Evidence for the involvement of arabinogalactan-proteins in cell proliferation. **1994.** Planta. 193: 542-550.

Sharom F.J., Radeva G. GPI-anchored protein cleavage in the regulation of transmembrane signals. **2004.** Subcellular Biochemistry, Vol 27: Membrane and Domains, chap 9: 285-315.

- Sharom F.J., McNeil G.L., Glover J.R., Seier S.** Modulation of the cleavage of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins by specific bacterial phospholipases. 1996. Biochem Cell Biol. 74: 701-713.
- Sheng J., D'Ovidio R., Mehdy M.C.** Negative and positive regulation of a novel proline-rich protein mRNA by fungal elicitor and wounding. 1991. Plant J. 1: 345-354.
- Sherrier D.J., Prime T.A., Dupree P.** Glycosylphosphatidylinositol-anchored cell-surface proteins from Arabidopsis. 1999. Electrophoresis. 20: 2027-2035.
- Showalter A.M.** Structure and function of plant cell wall proteins. 1993. Plant Cell. 5: 9-23.
- Showalter A.M., Zhou J., Rumeau D., Worst S. G., Varner J.E.** Tomato extensin and extensin-like cDNAs: structure and expression in response to wounding. 1991. Plant Mol Biol. 16: 547-565.
- Showalter A.M., Varner J.E.** Plant hydroxyproline-rich Glycoprotein. 1989. The Biochemistry of plant. 15: 485-520.
- Showalter A.M.** Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. 2001. Cell Mol Life Sci. 58: 1399-1417.
- Simons K., Ikonen E.** Functional rafts in cell membranes. 1997. Nature. 387: 569-572.
- Smith D. L., Krikorian A. D.** Somatic embryogenesis of carrot in hormone-free medium: external pH control over morphogenesis. 1990. Am J Bot. 77: 1634-1647.
- Smith R.C., Fry S.C.** Endotransglycosylation of xyloglucans in plant cell suspension cultures. 1991. Biochem J. 279: 529-535.
- Smallwood M., Yates E.A., Willats W.G.T., Martin H., Knox J.P.** Immunocytochemical comparison of membrane-associated and secreted arabinogalactan-proteins in rice and carrot. 1996. Planta. 198: 452-459.
- Sommer-knudsen, J., Bacic A., Clarke A.E.** Hydroxyproline-rich plant glycoproteins. 1998. Phytochemistry. 47: 483-497.
- Spiro M.D., Ridley B.L., Eberhard S., Kates K.A., Mathieu Y., O'Neill M.A., Mohnen D., Guern J., Darvill A., Albersheim P.** Biological activity of reducing-end-derivatized oligogalacturonides in tobacco tissue cultures. 1998. Plant Physiol. 116: 1289-1298.
- Staelin L.A.** The plant ER: a dynamic organelle composed of a large number of discrete functional domains. 1997. Plant J. 11: 1151-1165.
- Staelin L.A., Moore I.** The plant golgi apparatus: structure, functional organization and trafficking mechanisms. 1995. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol. 46: 261-288.

Suzuki Y., Kitagawa M., Knox J.P., Yamaguchi I. A role for arabinogalactan proteins in gibberellin-induced alpha-amylase production in barley aleurone cells. **2002.** The Plant Journal. 29: 733-741.

T

Takahashi M., Inoue N., Ohishi K., Maeda Y., Nakamura N., Endo Y., Fujita T., Takeda J., Kinoshita T. PIG-B, a membrane protein of the endoplasmic reticulum with a large luminal domain, is involved in transferring the third mannose of the GPI anchor. **1996** EMBO J. 15: 4254-4261.

Takos A.M., Dry I.B., Soole K.L. Detection of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins on the surface of *Nicotiana tabacum* protoplasts. **1997.** FEBS Letters. 405: 1-4.

Tanaka M., Shibata H., Uchida T. A new prolyl hydroxylase acting on poly-L-proline, from suspension cultured cells of *Vinca rosea*. **1980.** Biochim Biophys Acta. 616: 188-198.

Tanaka M., Sato K., Uchida T. Plant prolyl hydroxylase recognizes poly(L-proline) II helix. **1981.** J Biol Chem. 256: 11397-11400.

Tautorus T.E., Wang H., Fowke L.C., Dunstan D.I. Microtubule pattern and the occurrence of pre-prophase bands in embryogenic cultures of black spruce (*Picea mariana* Mill) and non-embryogenic cultures of jack pine (*Pinus banksiana* Lamb.). **1992.** Plant Cell Rep. 11: 419-423.

Timmers A.C.J., Reiss H.D., Bohsung J., Traxel K., Schel J.H.N. Localization of calcium during somatic embryogenesis of carrot (*Daucus carota* L). **1996.** Protoplasma. 190: 107-118.

Thomas T. L. Gene Expression during Plant Embryogenesis and Germination: An Overview. **1993.** Plant Cell. 10: 1401-1410.

Thompson J.E., Fry S.C. Evidence for covalent linkage between xyloglucan and acidic pectins in suspension-cultured rose cells. **2000.** Planta. 211: 275-286.

Thompson H.J.M., Knox J.P. Stage-specific response of embryogenic carrot cell suspension cultures to arabinogalactan protein-binding β -glucosyl Yariv reagent. **1998.** Planta. 205: 32-38.

Toonen M.A.J., Hendriks T., Schmidt E.D.L., Verhoeven H.A., Van Kammen A., De Vries S.C. Description of somatic-embryo-forming single cells in carrot suspension cultures employing video cell tracking. **1994.** Planta. 194 : 565-572.

Trigano R.N., Gray D.J., Conger B.V., McDaniel J.K. Origin of direct somatic embryos from cultured leaf segments of *Dactylis glomerata*. **1989.** Bot Gaz. 150: 72-75.

U

Udenfriend S., Kodukula K. Prediction of [omega] site in nascent precursor of glycosylphosphatidylinositol protein. **1995.** Methods in Enzymology. 250: 571-582

V

- Van Hengel A.J., Tadesse Z., Immerzeel P., Schols H., van Kammen A., de Vries, S.C. N-acetylglucosamine and glucosamine-containing arabinogalactan proteins control somatic embryogenesis. 2001. Plant Physiol. 125: 1880-1890.
- Van Holst G.J., Varner J.E. Reinforced polyproline II conformation in a hydroxyproline-rich cell wall glycoprotein from carrot root. 1984. Plant Physiol. 74: 247-251.
- Van Holst G.J., Klis F.M., Dewildt P.J.M., Hazenberg C.A.M, Buijs J., Stegwee. Arabinogalactan-protein from a crude cell organelle fraction of *Phaseolus vulgaris* L. 1981. Plant Physiol. 68: 910-913.
- Van Holst G.J., Clarke A.E. Quantification of arabinogalactan-protein in plant extracts by single radial gel diffusion. 1985. Anal Biochem. 148: 446-450.
- Vasil V., Redway F., Vasil I.K. Regeneration of plan from embryogenic suspension culture protoplasts of wheat (*Triticum aestivum* L.) 1990. Biotechnology. 8: 429-434.
- Veisseire P., Linnossier L., Coudret A. Effect of abscisic acid and cytokinins on development of somatic embryos in *Hevea brasiliensis*. 1994. Plant Cell Tiss and Org Cult. 39: 219-223.
- Verdeil J. L., Hocher V., Huet C., Grosdemange F., Escoute J., Ferriere N., Nicole M. Ultrastructural Changes in Coconut Calli Associated with the Acquisition of Embryogenic Competence. 2001. Annals of Botany. 88: 9-18.
- Vernon D.M., Meinke D.W. Embryogenic Transformation of the Suspensor in twin, a Polyembryonic Mutant of Arabidopsis. 1994. Developmental Biology. 165 : 566-573.
- Vieitez F.J., Ballester A., Vieitez A.M. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cell suspension cultures of *Fagus sylvatica* L. 1992. Plant Cell Rep. 11: 609-613.
- Vissenberg K., Martinez-Vilchez I. M., Verbelen J. P., Miller J. G., Fry S. C. In vivo colocalization of xyloglucan endotransglycosylase activity and its donor substrate in the elongation zone of Arabidopsis roots. 2000. Plant Cell. 12: 1229-1237.
- Vroemen C.F., De Vries S.F., Quatrano R. Signalling in plant embryos during the establishment of the polar axis. 1999. Semin Cell Dev Biol. 10: 157-64.

W

- Watanabe R., Inoue N., Westfall B., Taron CH., Orlean P., Takeda J., Kinoshita T. The first step of glycosylphosphatidylinositol biosynthesis is mediated by a complex of PIG-A, PIG-H, PIG-C and GPI1. 1998. EMBO J. 17:877-885.
- Watanabe R., Ohishi K., Maeda Y., Nakamura N., Kinoshita T. Mammalian PIG-L and its yeast homologue Gpi12p are N-acetylglucosaminylphosphatidylinositol de-N-acetylases essential in glycosylphosphatidylinositol biosynthesis. 1999. Biochem J. 339: 185-192.

West M., Harada J.J. Embryogenesis in Higher Plants: An Overview. 1993. The Plant Cell. 5: 1361-1369.

Willats W.G., Knox J.P. A role for arabinogalactan-proteins in plant cell expansion: evidence from studies on the interaction of beta-glucosyl Yariv reagent with seedlings of *Arabidopsis thaliana*. 1996. Plant J. 9: 919-925.

Williams E.G., Maheswaran G. Somatic embryogenesis: factor influencing coordinate behaviour of cells as an embryogenic group. 1986. Ann Bot. 57: 443-462.

Wojtaszek P. Genes and plant cell walls: a difficult relationship. 2000. Biol Rev Camb Philos Soc. 75: 437-475.

Wojtaszek P., Smith C.G., Bolwell G.P. Ultrastructural localisation and further biochemical characterisation of prolyl 4-hydroxylase from *Phaseolus vulgaris*: comparative analysis. 1999. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 31: 463-477.

Wu H.M., Wong E., Ogdahl J., Cheung A.Y. A pollen tube growth-promoting arabinogalactan protein from *Nicotiana glauca* is similar to the tobacco TTS protein. 2000. Plant J. 22: 165-176.

Y

Yariv J., Rapport M.M., Graf L. The interaction of glycosides and saccharides with antibody to the corresponding phenylazo glycosides. 1962. Biochem J. 85: 383-388.

Yariv J., Lis H., Katchalski E. Precipitation of Arabic acid and some seed polysaccharides by glycosylphenylazo dyes. 1967. Biochem J. 105: 1C-2C.

Yates E.A., Valdor J.F., Haslam S.M., Morris H.R., Dell A., Mackie W., Knox J.P. Characterization of carbohydrate structural features recognized by anti-arabinogalactan protein monoclonal antibodies. 1996. Glycobiology. 6: 131-139.

Yazawa K., Takahata K., Kamada H. Isolation of the gene encoding Carrot leafy cotyledon1 and expression analysis during somatic and zygotic embryogenesis. 2004. Plant Phys Biochem. 42: 215-223.

Youl J.J., Bacic A., Oxley D. Arabinogalactan-proteins from *Nicotiana glauca* and *Pyrus communis* contain glycosylphosphatidylinositol membrane anchors. 1998. Proc Natl Acad Sci USA. 95: 7921-7926.

Z

Zarsky V., Garrido D., Rihova L., Tupy J., Vicente O., Heberleborgs E. Derepression of the cell cycle by starvation is involved in the induction of tobacco pollen embryogenesis. 1992. Sex Plant Reprod. 5: 189-194.

Zhang Y., Sederoff R.R., Allona I. Differential expression of genes encoding cell wall proteins in vascular tissues from vertical and bent loblolly pine trees. 2000. Tree Physiol. 20: 457-466.

Zhao Z.D., Tan L., Showalter A.M., Lampion D.T., Kieliszewski M.J. Tomato LeAGP-1 arabinogalactan-protein purified from transgenic tobacco corroborates the Hyp contiguity hypothesis. 2002. Plant J. 31: 431-444.

Zimmerman J.L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. 1993. Plant Cell. 5: 1411-1423.

Zorinants S.E., Nosov A.V., Monforte-Gonzalez M., Mendes-Zeel M., Loyola-Vargas V.M. Variation of nuclear DNA content during somatic embryogenesis and plant regeneration of *Coffea arabica* L. using cytophotometry. 2003. Plant Science. 164: 141-146



ANNEXES

Annexe 1: Milieu de culture M17S20

Le milieu M17S20 est un milieu modifié de Murashige et Skoog (MS) (1962) (annexe 4) composé de deux ou trois solutions (si présence de glycérol) solutions A, B et C assemblées après autoclavage de celle-ci.

Solution A: (QSP à 700 ml ou 600 ml si présence de glycérol)

Macroéléments:	CaCl ₂	MS/2	5 ml
	MgSO ₄	MS/2	5 ml
	NH ₄ NO ₃	MS/2	5 ml
	KCl	Heller	10 ml
Microéléments:		Heller	1 ml
Glutamine:			250 mg
Inositol :			100 mg
Vitamine de Morel et Wetmore :			10 ml
2iP (SM: 0,1 mg/ml):			5 ml
ANA (SM: 0,1 mg/ml):			0,2 ml
Saccharose:			20 g
			pH 5,5

Solution B: (QSP 300 ml)

KH ₂ PO ₄	MS/2	5 ml
Fe-EDTA	MS/2	5 ml
		pH 5,5

Solution C: (QSP 100 ml)

Glycérol	24 ml
----------	-------

Le milieu H5 est basé sur le milieu de culture déterminé par Heller (1953) (annexe 5).

Annexe 2: Milieu de regeneration H5

Macroéléments:	KCl	Heller	10 ml
	NaNO ₃	Heller	10 ml
	CaCl ₂ ,2H ₂ O	Heller	10 ml
	NaH ₂ PO ₄ ,H ₂ O	Heller	10 ml
	MgSO ₄ ,7H ₂ O	Heller	10 ml
Microéléments:		Heller	1 ml
Fe/EDTA:		MS/2	5 ml
Inositol:			100 mg
Vitamine de Morel et Wetmore :			10 ml
Saccharose :			5 g
Agar :			4,5 g
			QSP 1 L
			pH 5,5

Annexe 3: Milieu de bourgeonnement Bg 0,5 :

Macroéléments:	KCl	Heller	10 ml
	NaNO ₃	Heller	10 ml
	CaCl ₂ .2H ₂ O	Heller	10 ml
	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	Heller	10 ml
	MgSO ₄ .7H ₂ O	Heller	10 ml
Microéléments:		MS	10 ml
Fe/EDTA:		MS/2	5 ml
Inositol:			100 mg
Vitamine de Morel et Wetmore :			10 ml
BAP (SM: 0,1 mg/ml)			5 ml
Saccharose :			5 g
Agar :			6 g
			QSP 1 L
			pH 5,5

Annexe 4: Composition du milieu de Murashige et Skoog:**Macroéléments de Murashige et Skoog :**

CaCl ₂	2,99 mM
KH ₂ PO ₄	1,25 mM
KNO ₃	18,79 mM
MgSO ₄	1,50 mM
NH ₄ NO ₃	20,61 mM

Microéléments de Murashige et Skoog :

CoCl ₂ , 6H ₂ O	0,11 µM
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,10 µM
FeNa-EDTA	0,10 µM
H ₃ BO ₃	0,10 µM
KI	5,00 µM
MnSO ₄ , H ₂ O	0,10 µM
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	1,03 µM
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	29,91 µM

Annexe 5: Composition du milieu de Murashige et Skoog:**Microéléments de Heller**

$\text{AlCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$	0,22 μM
$\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$	0,12 μM
H_3BO_3	0,10 μM
KI	0,06 μM
$\text{MnSO}_4, \text{H}_2\text{O}$	0,45 μM
$\text{NiCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$	0,13 μM
$\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	3,48 μM

Macroéléments de Heller

CaCl_2	0,51 mM	
KCl	10,06 mM	
MgSO_4	1,01 mM	
NaNO_3	7,06 mM	
NaH_2PO_4	0,91	mM

The image features four purple flowers on green stems, arranged in a cross-like pattern. The flowers have many thin, pointed petals. The background is a soft, light blue-grey gradient. The text is centered over the flowers.

**COLLOQUES SCIENTIFIQUES
ET
PUBLICATIONS**

Participation aux colloques nationaux et internationaux

- Congrès de la Société Française d'Electrophorèse et d'Analyse Protéomique: Les applications de la protéomique, LILLE du 16-18 Octobre 2002. Présentation d'un poster:

Identification and characterisation of arabinogalactan proteins (AGPs) involved in *Cichorium* somatic embryogenesis. D Windels, A-S Blervacq, C Capon, J-C Michalski, J-l Hilbert.

- 7^é International Congress of Plant Molecular Biology, BARCELONNE du 23-28 Juin 2003. Présentation d'un poster:

Characterization of arabinogalactan-proteins secreted by leaf-tissues of *Cichorium* submitted to somatic embryogenesis. D. Windels, A-S. Blervacq, C. Capon, J-C. Michalski, J-L. Hilbert.

- 5^é Colloque général de la Société française de Physiologie Végétale: Plant biology and the Challenge of Functional Genomics, ORSAY du 9-11 Juillet 2003. Présentation de deux posters :

Contribution to the characterization of cell reactivation stages leading to organogenesis, embryogenesis or nodular structure in two genotypes of *Cichorium*. M. Demilly, D. Windels, A.S. Blervacq, B. Delbreil, M.C. Quillet, J.L. Hilbert.

Physiological approach of the regulatory action of arabinogalactan proteins AGPs during *Cichorium* somatic embryogenesis. D. Windels, M. Demilly, A.S. Blervacq, J.P. Couillerot, C. Capon, B. Delbreil, M.C. Quillet, J.C. Michalski, J.L. Hilbert.

- Xth Cell Wall Meeting, Sorrento du 9 Aout-3 Septembre 2004. Présentation de deux posters:

Correlation between the extracellular arabinogalactan proteins secreted in the culture medium and the embryogenic potential of chicory. A-S Blervacq, D Windels, I Habarugira, J-P Couillerot, E Goulas, M-C Quillet, B Delbreil, C Capon, J-C Michalski, J-l Hilbert.

Detection of the secreted AGP set in the culture medium of two halsib genotypes of chicory. D Windels, I Habarugira, A-S Blervacq, J-P Couillerot, E Goulas, M-C Quillet, B Delbreil, C Capon, J-C Michalski, J-l Hilbert.

- Journées Réseau Français des Parois, université de Rouen 8-9 septembre 2005: Présentation d'un poster :

Implication of AGP-GPIs in *Cichorium* somatic embryogenesis. Windels D, Habarugira I, Blervacq A-S, Leroy Y, Zanetta J-P, Michalski J-C, Hilbert J-L.

- Journée arabinogalactane-protéines, université de Rouen 7 septembre 2005 : Conférence orale.

Étude de l'implication des arabinogalactane-protéines (AGPs) au cours de l'embryogenèse somatique chez différents génotypes de chicorée.

Publications parues

Mars 2003: cDNA-AFLP display for the isolation of differentially expressed genes during chicory root development. Goupil P, Mahamoud YS, Poulain J, Windels D, Crété P, Huss B, Rambour S. J Plant Physiol. 2003, 160(3):303-309.

Publications soumises

GPI-anchored AGPs are released during somatic embryogenesis in *Cichorium*.
D. WINDELS, I. HABARUGIRA, A-S. BLERVACQ, J-P. ZANETTA, Y. LEROY, B. DELBREIL, M-C. QUILLET, E. GOULAS, J-P. COUILLEROT, J-C. MICHALSKI, J-L. HILBERT.
(Soumission à Planta depuis le 21 juillet 2005)

Publications en préparations

Effects of plant pretreatments on somatic embryogenesis in embryogenic and recalcitrant *Cichorium* cultivars, I. Characterisation of pre-treatment.
François MOREEWS, Lydie BATEL, David WINDELS, Jean-Paul COUILLEROT, Anne-Sophie BLERVACQ, Jean-Louis HILBERT.
(Soumission à Plant Physiol Bioch prévue avant la soutenance de thèse).

Effects of plant pretreatments on somatic embryogenesis in embryogenic and recalcitrant *Cichorium* cultivars, II. Involvement of AGPs.

David WINDELS, Magali DEMILLY, Anne-Sophie BLERVACQ, Jean-Paul COUILLEROT, Calliope CAPON, Jean Claude MICHALSKI, Jean-Louis HILBERT.
(Soumission à Plant Physiol Bioch prévue avant la soutenance de thèse)

Precocious phases of organogenesis and somatic embryogenesis in genotypes of Chicory, I: Co-influence of genotypes and effects of conditioned medium.

L. Batel, M. Demilly, D. Windels, A.S. Blervacq, J.L. Hilbert, J.P. Couillerot.
(En cours de rédaction Plant Science)

Precocious phases of organogenesis and somatic embryogenesis in genotypes of Chicory, II: Characterisation of Kospol genotypes and implication of AGPs.

M. Demilly , D. Windels, M.C. Quillet, B. Delbreil, J.P. Couillerot, J.L. Hilbert, A.S. Blervacq

(En cours de rédaction Plant Science)

Résumé

L'embryogenèse somatique (ES) est un processus au cours duquel des cellules différenciées se dédifférencient pour ensuite réorienter leur programme génétique vers une voie embryogène. Le contrôle de ce processus fait intervenir de nombreuses protéines dont les arabinogalactane-protéines (AGPs). Ces AGPs sont glycosylées et riches en résidus hydroxyproline. Notre objectif est l'étude de l'implication des AGPs au cours des phases précoces de l'ES chez différents génotypes de Chicorée. Le prétraitement de plantes mères (ABA+Spermine+Glycérol) a permis de corrélérer le nombre d'embryons produits à une augmentation de la quantité d'AGPs libérées dans le milieu de culture et ce quels que soient les organes cultivés. Cette libération d'AGPs semble spécifique des génotypes embryogènes. L'identification des AGPs a été entreprise par électrophorèse monodimensionnelle, par HPLC et par immunolocalisation. Un marquage différentiel des structures embryogènes par l'anticorps JIM16 a été observé sur des coupes d'organes chez un génotype embryogène. Toutefois ce marquage n'est pas observé chez tous les génotypes embryogènes. Nos travaux montrent également que l'addition simultanée de proline et de galactosamine favorise l'ES. L'analyse cytologique des différentes phases du processus d'ES et l'emploi du réactif de β -D-Glc Yariv montrent que la libération des AGPs est un préalable nécessaire à l'expression de l'ES. L'utilisation d'inhibiteurs de phospholipases (PLC et PLD), et l'analyse par GC/MS, ont permis de montrer que la plupart des AGPs libérées possèdent une ancre GPI.

Mots clés : *Cichorium intybus*, embryogenèse somatique, arabinogalactane-protéines, ancre GPI.

Abstract

During Somatic embryogenesis (SE), differentiated cells dedifferentiate to redirect their genetic program towards an embryogenic pathway. The control of this process involves many proteins among which the arabinogalactan proteins (AGPs). These AGPs are highly glycosylated and rich in hydroxyproline. Our objective is to study the implication of AGPs during early phases of SE in various Chicory genotypes. After pretreatment (ABA+Spermine+Glycerol), the number of somatic embryos obtained increased similarly to the level of AGPs released in the culture medium whatever the cultivated organs. This release of AGPs seems specific of embryogenic genotypes. The identification of AGPs was undertaken by monodimensional electrophoresis, HPLC and by immunolocalisation. A JIM16 antibody reacts specifically with the embryogenic structures of an embryogenic responsive genotype. However this result could not be extended to other embryogenic genotypes. A supplementation of the medium with proline combined to galactosamine increased the ES. The cytological analysis of the various phases of the SE process and the use of the β -D-Glc Yariv reagent suggest that the release of AGPs is a precondition necessary to the ES expression. The use of phospholipases (PLC and PLD) inhibitors and the analyze by GC/MS showed that the majority of AGPs released have a GPI anchor.

Key words: *Cichorium intybus*, somatic embryogenesis, arabinogalactan-proteins, GPI anchor.