

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

**Croissance du tube pollinique chez *Papaver rhoeas* :  
de nouveaux rôles pour le cytosquelette**

par  
Olivier Gossot

Département de Sciences Biologiques - IRBV  
Faculté des Arts et des Sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise  
en sciences biologiques

avril 2007

© Olivier Gossot, 2007



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Croissance du tube pollinique chez *Papaver rhoeas* :  
de nouveaux rôles pour le cytosquelette**

présenté par :  
Olivier Gossot

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Jean Rivoal , président-rapporteur  
Anja Geitmann, directeur de recherche  
David Morse, membre du jury

## Résumé

La reproduction chez les végétaux supérieurs implique le transport des gamètes mâles jusqu'aux ovules. Ce processus a lieu grâce à une cellule unique : le tube pollinique. Les caractéristiques de cette cellule, notamment sa vitesse et son mode de croissance anisotrope, en ont fait du tube pollinique un modèle cellulaire couramment utilisé pour les études des mécanismes qui contrôlent la croissance cellulaire.

Lorsque que le grain de pollen a atteint la surface du stigmate il développe un tube qui pénètre le stigmate puis croît dans le tissu transmissif du style jusqu'à l'ovule. Ce milieu crée une résistance physique à l'élongation de la cellule. L'expansion du tube pollinique est restreinte à l'apex du tube. Ce type de croissance appelé croissance apicale fait appel à différents composants cellulaires qui ont déjà été beaucoup étudié. Parmi eux, le cytosquelette est une structure pour laquelle de nombreux rôles dans la croissance du tube pollinique ont été décrits.

Nous nous sommes intéressés aux rôles mécaniques du cytosquelette, c'est-à-dire aux rôles impliqués dans le processus permettant au tube pollinique de pénétrer la surface du stigmate puis de croître dans un milieu solide tel que le tissu transmissif du style. Nous avons plus particulièrement observé la force de percée et le maintien de la direction de croissance. En utilisant différents tests mécaniques combinés a deux drogues (orysaline et latrunculine B) dégradant les microtubules et les filaments d'actine respectivement, nous avons montré que les filaments d'actine sont impliqués dans la force de croissance du tube pollinique, tandis que les microtubules seraient, eux, impliqués dans le maintien de la direction de croissance. Notre volonté de mettre en relation ces rôles mécaniques avec la structure du cytosquelette nous a conduit à améliorer nos protocoles de marquage de l'actine F et de la tubuline. Nous avons ainsi observé de manière directe l'effet des deux drogues sur le cytosquelette et déterminé qu'il existe des interactions entre microtubules et filaments d'actine chez le tube pollinique. Ces observations microscopiques nous ont également permis d'observer une organisation caractéristique de l'actine sous-apicale chez *Papaver rhoeas* : Le cylindre cortical d'actine. Sa localisation nous a conduit à étudier son

rôle dans la force de percée du tube pollinique. A notre surprise la localisation de ce cylindre ne semble pas jouer un rôle central dans la capacité du tube pollinique à croître dans un milieu résistant tel que l'agarose ou le tissu transmissif du style.

**Mots-clés** : Croissance apicale, cytomécanique, cytosquelette, filaments d'actine, MBS-ester, microtubules, tube pollinique

## Abstract

The reproduction of higher plants implies the transport of sperm cells from the pollen grain (once it is attached to the stigma) to the ovules. This transport is performed through formation of an extremely long cellular protuberance: the pollen tube. Its important role in plant reproduction, the speed and the extreme anisotropy of its growth make the pollen tube a widely used model.

The elongation of the pollen tube is restricted to the apex of the cell. This so called apical growth depends on the functioning of and collaboration between various cellular components which are being studied extensively, by numerous labs. Among the crucial structures is the cytoskeleton for which multiple functions have been described concerning the growth of the pollen tube.

We focused on the mechanical role of the cytoskeleton in apical growth, focusing in particular on the process allowing the pollen tube to penetrate the stigmatic surface and to invade a solid matrix such as the stylar tissue. We assessed the penetration force and growth direction using various mechanical tests and two drugs (oryzalin and latrunculin B) degrading microtubules and actin filaments. We showed that the actin filaments are implicated in the generation of an invasive growth force, while the microtubules may be implied in the determination of the growth direction.

To be able to correlate these mechanical aspects with the spatial configuration of the cytoskeleton we attempted to optimize our labelling protocols for filamentous actin and tubulin. This allowed us to visualize the effect of the two drugs on the cytoskeleton revealing that microtubules and actin filaments interact in pollen tubes. These microscopic observations also allowed us to observe a cortical fringe structure characterizing the sub-apical actin cytoskeleton in pollen tubes of the species we studied - *Papaver rhoeas*. This led us to study the role of this fringe in the generation of the growth force and in directional growth.

**Keywords :** Actin filaments, apical growth, cytoskeleton, growth force, MBS-ester, microtubules, pollen tube

## Table des matières

Introduction générale.....	1
I.1 Principes généraux de la reproduction sexuée chez les plantes .....	1
I.2 Le tube pollinique, une cellule à croissance apicale .....	2
<i>Exocytose, cytosquelette et flux cytoplasmique</i> .....	3
<i>La turgescence</i> .....	4
<i>La paroi cellulaire</i> .....	4
<i>Ions, gradients et oscillations</i> .....	5
I.3 Le tube pollinique, du stigmate à l'ovule.....	7
I.4 Introduction au cytosquelette .....	9
<i>Microtubules</i> .....	9
<i>Filaments d'actine</i> .....	11
<i>Dynamique du cytosquelette</i> .....	12
<i>Le cytosquelette de la cellule végétale</i> .....	13
I.5 Le cytosquelette du tube pollinique .....	15
<i>Organisation des microtubules</i> .....	15
<i>Organisation des filaments d'actine</i> .....	16
<i>Le rôle des microtubules</i> .....	18
<i>Le rôle des filaments d'actine</i> .....	19
<i>Protéines de liaisons au cytosquelette, gradients ioniques et interactions</i> .....	20
I.6 Biomécanique et force de croissance cellulaire .....	22
<i>Généralités sur la biomécanique</i> .....	22
<i>Force de percée chez les hyphes fongiques</i> .....	25
I.7 Croissance apicale : de nouveaux rôles pour le cytosquelette .....	26
<i>Force de croissance</i> .....	26
<i>Maintien de la forme de la cellule et résistance à la pression</i> .....	27
<i>Direction de croissance</i> .....	27
I.8 Objectifs et motivation.....	28

I.9 Approches et stratégies .....	29
Références .....	29
Chapitre 1: .....	40
Abstract .....	41
Keywords.....	41
1.1 Introduction .....	42
1.2 Materials and methods.....	44
<i>Pollen tube growth</i> .....	44
<i>Mechanical obstacle assay</i> .....	44
<i>Fluorescent labeling for actin filaments</i> .....	45
<i>Fluorescent labeling for tubulin</i> .....	46
<i>Microscopy</i> .....	46
1.3 Results .....	47
<i>Actin depolymerization reduces the pollen tube's capacity to germinate and grow in stiffened medium</i> .....	47
<i>Actin depolymerization changes the ratio of pollen tubes invading a mechanical obstacle</i> .....	48
<i>Microtubules do not seem to be involved in the capacity to invade an obstacle</i> .....	49
<i>Implication of the cytoskeleton in the determination of the growth direction</i> .....	50
<i>Combined effect of latrunculin B and oryzalin</i> .....	54
<i>Interaction between actin filaments and microtubules</i> .....	55
1.4 Discussion .....	59
<i>Actin filaments but not microtubules influence the pollen tube's behavior upon encountering a mechanical obstacle</i> .....	59
<i>Microtubules may be implicated in changing the growth direction</i> .....	62
<i>Actin filaments and microtubules interact</i> .....	63
1.5 Conclusions .....	65
1.6 Acknowledgements .....	65

References .....	66
Chapitre 2 .....	70
2.1 Introduction .....	71
2.2 Marquage des microtubules.....	72
2.3 Marquage et organisation des filaments d'actine .....	76
2.4 Discussion sur l'organisation de l'actine sous-apicale .....	80
Références .....	84
Chapitre 3 .....	86
Préambule .....	87
3.1 Le rôle du cylindre d'actine sous-apicale dans la croissance et le maintien de la forme du tube pollinique .....	87
<i>Le cylindre d'actine et la croissance du tube pollinique.....</i>	<i>87</i>
<i>Le rôle du cylindre d'actine dans le maintien de la forme apicale du tube pollinique.....</i>	<i>90</i>
<i>Le rôle du cylindre d'actine dans la direction de croissance du tube pollinique .....</i>	<i>92</i>
3.2 Marquage de la callose et des filaments d'actine in vivo.....	92
3.3 Marquage de l'actine chez <i>Lilium orientalis</i> .....	95
Références .....	96
Discussion et perspectives.....	98
Références .....	105
Annexes .....	I

## Liste des figures

- Figure 1** Schématisation du trafic intracellulaire, de l'exocytose et des gradients des ions  $H^+$  et  $Ca^{2+}$ . La bande alcaline colocalise avec le dense réseau d'actine sous-apicale. Les gros organelles font demi-tour au niveau de ce réseau (formant un mouvement de fontaine inversée), tandis que les vésicules de sécrétions vont jusqu'à l'apex. L'entrée des ions  $H^+$  et  $Ca^{2+}$  a lieu à l'apex créant ainsi un gradient de calcium et d'acidité. p.6
- Figure 2** Modèle de polymérisation de la tubuline. A. hétérodimère de tubuline  $\alpha$  et de tubuline  $\beta$ . B. un protofilament. C. 13 protofilaments placés en cylindre forment un microtubule. D. un microtubule vu en microscopie électronique à transmission (MET). Figure issue de Alberts et al., 2002 p.10
- Figure 3** Modèle de polymérisation de l'actine. A. Monomère d'actine G. B. Les filaments d'actine sont regroupés par deux et forment une hélice. C. Filament d'actine vu en microscopie électronique à transmission (MET). Figure issue de Alberts et al., 2002 p.11
- Figure 4** Dynamique du cytosquelette. A. La polymérisation de l'actine est plus rapide à l'extrémité plus qu'à l'extrémité moins. B. Modèle général de polymérisation des monomères. La courbe décrit trois phases, une phase de latence, suivit d'une phase de croissance rapide et finalement un état d'équilibre. C. Processus de « treadmilling » chez les filaments d'actine. D. Processus d'instabilité dynamique chez les microtubules. A. Inspiré de Alberts et al., 2002; B,C,D issus de Alberts et al., 2002. p.12
- Figure 5** Organisation des microtubules chez les tubes polliniques de *Papaver rhoeas*. 1. Partie distale du tube pollinique, les microtubules sont longs et axiaux. 2. Cellule générative contenue dans une « cage » de microtubules. 3. section située au-delà de la cellule générative. Seuls des fragments de microtubules sont visibles et leur orientation est aléatoire. L'apex du tube ne contient généralement pas de microtubules. Barre=8 $\mu$ m. p.15
- Figure 6** Organisation des filaments d'actine. 1. L'apex contient seulement de courts fragments d'actine F. 2. La région sous-apicale forme un réseau très dense d'actine qui à généralement la forme d'un cylindre cortical. 3,4. Ce cylindre est suivit d'un cône d'actine qui assure la transition entre l'actine corticale et un faisceau central de microfilaments. 5. L'actine en partie distale est aussi bien corticale que centrale. Barre=8 $\mu$ m. p.17
- Figure 7** Méthode de mesures directes et indirectes de la force de croissance chez les hyphes fongiques. A,B. Évaluations indirectes par pénétration de milieux d'agarose ou de membranes. C,D. Mesures directes par l'utilisation de la « strain gauge » ou par « waveguide microscopy ». Figure issue de Bastmeyer et al., 2002. p.23
- Figure 8** Micrograph of pollen tubes grown in the *in vitro* obstacle assay. Two adjacent portions of agarose containing growth medium (1% and 2%) are spread as a 1 mm thick layer on a microscope slide. Pollen grains are included in the 1% agarose containing growth medium. 90 min after germination, the tubes that have reached the interface between the two media are counted. The ratio between tubes that have crossed the interface (arrows) and all tubes that either crossed or touched the interface while being deviated (arrowheads) is calculated and reflects the ability of pollen tubes to invade the obstacle. Barre = 100  $\mu$ m. p.44

- Figure 9** Effect of drugs interfering with cytoskeletal functioning on pollen germination and tube growth in liquid medium and media stiffened with 1% and 3% agarose. a,b. Germination rate of pollen incubated in the presence of latB (a) or oryzalin (b). c,d. Tube length after 90 min incubation in the presence of latB (c) or oryzalin (d). Results were normalized to the respective agarose control without the drug. Data are average values from 8 repetitions of the experiment. p.47
- Figure 10** Penetration rate of pollen tubes in the *in vitro* penetration assay. a. Penetration rates of pollen tubes grown for 90 min in the presence of low concentrations of latB. b. Penetration rates of pollen tubes grown for 90 min in the presence of microtubule disrupting concentrations of oryzalin. p.48
- Figure 11** Micrograph of pollen tubes grown in 1% agarose. The arrowheads indicate changes of growth direction. Big arrowheads (marked for two pollen tubes - PT1, PT2) are lasting changes that were above 20° and after which the tube maintained the new direction for at least 50 μm. Small arrowheads (marked for PT1 only) indicate small changes of direction that had either a smaller angle or were not lasting. Arrows indicate the turning behavior of the tube on the first 50 μm after emergence from the grain. Bar = 100 μm. p.50
- Figure 12** Lasting changes of direction (C.O.D) divided by the tube length for pollen tubes grown in 1% agarose growth medium. Each data point corresponds to a pollen tube. The histogram represents the average value. a. Pollen tubes grown in the presence of oryzalin at concentrations that completely depolymerize microtubules. b. Pollen tubes grown in the presence of moderate concentrations of latB. Data points are spread out horizontally in increasing order in order to allow assessing the number of tubes without turns (data points located at y=0). n = 92 tubes for each sample in the oryzalin assay and n = 88 for each sample in the latB assay. p.51
- Figure 13** Effect of oryzalin on turning behavior as observed in the brightfield microscope. a. Control; b. 1 μM oryzalin; c. 5 μM oryzalin. Bar = 100 μm. p.52
- Figure 14** Effect of oryzalin (1 μM), latB (1.5 nM) and a combination of both oryzalin and latB (same concentrations as those in individual applications) on pollen germination in 1% agarose. p.53
- Figure 15** Immunofluorescence label of microtubules (a,c,e,g) and rhodamine phalloidin label of actin filaments (b,d,f,h) of pollen tubes grown in the presence of oryzalin (0.1 μM (c), 1 μM (d,e), 2 μM (f), 10 μM (g) 30 μM (h)). a and b are controls without the drug. All images are projections of z-stacks. Arrowheads indicate the tip of the pollen tube apex, the arrow indicates the generative cell. Bar = 8 μM. p.55
- Figure 16** Rhodamine phalloidin label of actin filaments (a,c,e,g,i) and immunofluorescence label of microtubules (b,d,f,h,j) in pollen tubes after 30 min of treatment with latB. a,b. controls; c,d. 3 nM latB; e,f. 5 nM latB; g,h. 10 nM latB; i,j. 100 nM latB. Insets: Swollen tips of pollen tubes treated with 5 nM and 10 nM latB are filled with speckled microtubule label. All images are projections. Arrowheads indicate the tip of the pollen tube apex. Bar = 8 μM. p.58
- Figure 17** Essais de marquage des microtubules dans différentes conditions. A. En agarose et avec l'utilisation de pectinase et de glucanase. B. En milieu liquide, avec utilisation de pectinase p.72

et glucanase. C. En milieu liquide, avec utilisation de Cellulysin© au lieu de la pectinase et de la glucanase.

- Figure 18** Organisation des microtubules tels qu'observés avec le nouveau protocole. A. Partie distale : longs microtubules axiaux. B. Cellule générative. C. Moitié apicale du tube : microtubules courts et ayant une orientation aléatoire. D. apex : pas de microtubules. Barre= 8µm p.75
- Figure 19** Organisation de l'actine sous-apicale. A. Protocole précédemment utilisé – réseau désorganisé d'actine sous-apicale. B. Nouveau protocole – cylindre cortical d'actine sous-apicale. Barre=10µM p.78
- Figure 20** Modèles de l'organisation du cytosquelette d'actine. A. Modèle de type « zipper » de l'organisation des filaments d'actine construit d'après l'observation en microscopie à fluorescence, lors de l'ajout de 10µM MBS-ester. Le MBS-ester regroupe les filaments en un faisceau central, jusqu'à un point critique où la tension des filaments due à leur ancrage probable à la membrane (losanges verts) empêche leur regroupement. Créant ainsi un cône. Le cylindre d'actine s'étend sur environ 5µm du fait du caractère progressif de l'action du MBS-ester et de l'arrêt de la croissance. Le grisé souligne le fait que contrairement aux deux autres modèles, celui-ci correspond au cas observé directement en fluorescence. Il ne s'agit donc pas d'une organisation hypothétique. B,C. Modèles suggérés de ce que serait l'organisation du cytosquelette d'un tube pollinique non affecté par les étapes de fixation et de marquage. L'anneau de demi-tour des voies d'actine correspond à une section plus courte et est situé plus proche de l'apex. B. Le gros faisceau central est absent. Dans ce modèle les filaments liés à l'anneau d'ancrage à la membrane sont tous corticaux. C. Application du modèle « zipper » à un tube non traité. Dans ce modèle, les voies de retour sont centrales. Un cône apparaît assurant la transition entre la localisation centrale et l'anneau d'actine sous-apicale. p.81
- Figure 21** Effet du MBS-ester (utilisé à 10µM, 10 à 20 minutes avant la fixation) sur la distance entre le cylindre d'actine et l'apex. Les pointillés indiquent la localisation de l'apex. Haut : marquage des filaments d'actine avec rhodamine-phalloïdine. Bas : microscopie en champ clair du même tube pollinique. Barre= 8µm p.87
- Figure 22** Morphologie de l'apex du tube pollinique suite à l'utilisation de 10µM MBS-ester. Toutes les images sont une combinaison d'une photo prise en DIC et d'une photo de marquage de l'actine avec rhodamine-phalloïdine. A-F. La section située entre le cylindre d'actine et l'apex garde un diamètre semblable à celui de la partie distale malgré l'absence de cytosquelette d'actine. G-J. De légères dépressions ou gonflements sont cependant visibles à l'extrémité apicale du cylindre d'actine. Barre= 8µm. p.90
- Figure 23** Marquage fluorescent de tubes polliniques germant in vivo chez *Solanum chacoense*. A,B. Marquage à l'aniline bleue de la callose. C,D. Marquage des filaments d'actine (rhodamine-phalloïdine). Barre= 8µm. p.93

**Figure 24**

Différents essais de fixations et de pré-fixations pour le marquage de l'actine (rhodamine-phalloïdine) chez *Lilium orientalis*. A. Préfixation : 20µM MBS-ester 20 minutes avant la fixation aux aldéhydes. B.C. Préfixation : 50µM MBS-ester 20 minutes avant la fixation aux aldéhydes. D. Préfixation : 200µM MBS-ester 20 minutes avant la fixation aux aldéhydes. E.F. Protocole de marquage de l'actine selon Lovy-Wheeler et al., 2005. Barre=20µm

p.95

## Liste des abréviations

### Unités

ABP : Actin binding protein

ADF : Actin depolymerizing factor

BDM : 2,3-butanedione monoxime

BK : Milieu de croissance établi par Brewbaker et Kwack (1963)

BSA : Albumin from bovine serum

ddH<sub>2</sub>O : Eau distillée deux fois

DIC : Differential interference contrast

EGTA : Éthylène glycol tetraacetic acid

Fig. : figure

GFP : Green fluorescent protein

IgG : Immunoglobuline G

IRBV: Institut de Recherche en Biologie Végétale

MAP : Microtubules associated proteins

MBS-ester : M-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysulphosuccinimide ester

Pipes : Piperazine-N,N'-bis[2-ethanesulfonic acid]

RPM : tours par minute

RT : Room temperature (Température de la pièce)

Sulfo-EGS : Éthylène glycol bis[sulfosuccinimidylsuccinate]

°C : degré Celcius

% : pourcentage

### ***Remerciements***

Je tiens avant tout à remercier ma directrice de recherche Anja Geitmann pour m'avoir accepté au sein du laboratoire et supporté dans mes recherches. Les deux ans passés dans ce laboratoire ont été pour moi une opportunité de me familiariser avec le monde de la recherche et d'effectuer mon premier projet d'envergure.

J'aimerais également remercier les membres de mon comité conseil : Jean Rivoal et David Morse pour l'attention qu'ils ont porté aux bases de mon projet.

Merci finalement à l'ensemble des personnes qui ont participé de prêt ou de loin à la réalisation de ce projet : les membres du laboratoire : Rabah Zerzour, Leila Aouar, Monisha Sanyal, Youssef Chebli, Firas Bou Daher, Jérôme Bove, Jens Kruger; Les étudiants de l'IRBV, les colocs et les parents.

# Introduction générale

## I.1 Principes généraux de la reproduction sexuée chez les plantes

Les végétaux ont recours à deux types de reproduction, la reproduction asexuée (ou végétative) et la reproduction sexuée; seul ce deuxième type de reproduction sera ici rapidement introduit en raison du rôle primordial qu'y jouent le pollen et le tube pollinique.

Le cycle de développement chez les végétaux supérieurs utilisant la reproduction sexuée comprend une alternance entre un stade diploïde (sporophyte) et un stade haploïde (gamétophyte). Les gamétophytes sont produits par le sporophyte. Ils sont représentés par le sac embryonnaire (dans l'organe femelle) et par les grains de pollen (partie mâle). La fécondation issue des gamètes mâles et femelles forme un embryon qui sera alors dispersé de différentes manières selon le type de graine auquel il appartient. La germination de la graine formera un nouveau sporophyte.

Sur le sporophyte, l'organe femelle (gynécée) est représenté par le pistil. Celui-ci est composé, de bas en haut, de l'ovaire, du style et du stigmate. L'organe de reproduction mâle (androcée) peut se trouver sur la même fleur ou sur un type de fleur différent de la partie femelle. Elle est représentée par les étamines qui portent à leur extrémité les anthères dans lesquels sont situés les grains de pollen.

La fécondation chez les plantes est basée sur la pollinisation. Suite à son dépôt sur le stigmate de la fleur femelle, le grain de pollen forme un tube, qui doit dans un premier temps pénétrer la surface du stigmate puis croître à l'intérieur du tissu transmissif du style

jusqu'à l'ovaire. Il doit trouver son chemin jusqu'à l'entrée de l'ovule au niveau du micropyle. Une fois en contact avec le sac embryonnaire de l'ovule, l'extrémité du tube éclate afin de délivrer les cellules spermatiques et ainsi assurer la fécondation.

Ce processus primordial à la reproduction sexuée rassemble de nombreux domaines de recherche tels que l'étude des mécanismes d'auto-incompatibilité, l'étude des signaux moléculaires nécessaires au guidage du tube pollinique, l'évolution des organes mâles et femelles, etc. Parmi tous ces domaines, beaucoup d'attention a été portée sur les mécanismes de croissance du tube pollinique et sur son parcours au travers de l'organe femelle jusqu'au lieu de la fécondation : l'ovule.

## **I.2 Le tube pollinique, une cellule à croissance apicale**

Le tube pollinique est la cellule végétale ayant la croissance la plus rapide (Taylor et Hepler 1997), cette caractéristique ainsi que sa relativement bonne capacité à croître *in vitro*, en font un modèle couramment utilisé parmi les cellules ayant un mode de croissance apical (poils racinaires, hyphes fongiques). Par ailleurs, son milieu de croissance *in vivo* : le tissu transmissif du style, en fait, avec les hyphes fongiques, un modèle privilégié d'études biomécaniques sur l'application de forces nécessaires à la pénétration de tissus végétaux.

Si la croissance du tube pollinique est rapide, cette vitesse n'est cependant pas constante. Il est apparu récemment que le taux de croissance oscille. Par exemple le tube pollinique du lys croît à une vitesse oscillant de 100 à 600nm/sec sur une période de 15 à 50 secondes (Cardenas et al. 2005; Holdaway-Clarke et Hepler 2003). La croissance apicale repose sur de nombreux processus cellulaires liés les uns aux autres et oscillant avec la même période que la vitesse de croissance, mais souvent avec une phase décalée (permettant ainsi des études des mécanismes de feedback qui contrôlent la croissance). En voici une énumération succincte.

### *Exocytose, cytosquelette et flux cytoplasmique*

Comme dans tout type de cellule, l'exocytose est un processus indispensable à la croissance du tube pollinique. L'altération de ce mécanisme ou de tout autre composant cellulaire qui y est lié mène à l'arrêt de la croissance.

L'exocytose consiste en la fusion des vésicules de sécrétion issues du Golgi, au niveau de la membrane plasmique. Chez les cellules à croissance apicale, ce processus a lieu uniquement à l'apex de la cellule. La fusion des vésicules permet l'apport de nouveau matériel membranaire, et ainsi l'expansion de la membrane nécessaire à l'augmentation du volume de la cellule (Picton et Steer 1983; Taylor et Hepler 1997). Chez l'hyphe *Neurospora crassa*, il a été calculé qu'environ 40 000 vésicules fusionnent à l'apex par minute et occupent environ 80% de la section de 1  $\mu\text{m}$  à l'apex (Bastmeyer et al. 2002).

Les vésicules de sécrétion sont transportées depuis la partie distale du tube jusqu'en partie sous-apicale le long des filaments d'actine (fig. 1). Les vésicules font ainsi partie du flux cytoplasmique qui s'étend également de la partie distale jusqu'en partie sous-apicale. La partie apicale du tube pollinique est dénuée de flux cytoplasmique ainsi que de réseau dense d'actine. Cette partie définie comme la zone claire, telle qu'observée au microscope optique, ne contient aucun organelle autre que les vésicules de sécrétion et un peu de réticulum endoplasmique. Les gros organelles font demi-tour au niveau de la partie sous-apicale en suivant les voies d'actine et repartent vers la partie distale (fig. 1). L'absence de flux cytoplasmique à l'apex semble être indispensable à l'exocytose des vésicules (Cardenas et al. 2005; Moscatelli et al. 1997; Vidali et Hepler 2001).

### *La turgescence*

Il est depuis longtemps suggéré que la croissance du tube pollinique repose sur la relation entre l'expansion de la membrane, la rigidité de la paroi et la pression de turgescence. Dans ce modèle la turgescence permettrait l'augmentation de volume du tube pollinique (Benkert et al. 1997; Zonia et al. 2006). Chez les plantes, la turgescence est connue comme étant la force permettant l'expansion cellulaire; cependant, aucune relation de proportionnalité n'a été trouvée entre la croissance cellulaire et la turgescence aussi bien chez les hyphes que chez les tubes polliniques (Benkert et al. 1997; Kaminskyj et al. 1992; Talbot 1999; Zonia et al. 2006).

### *La paroi cellulaire*

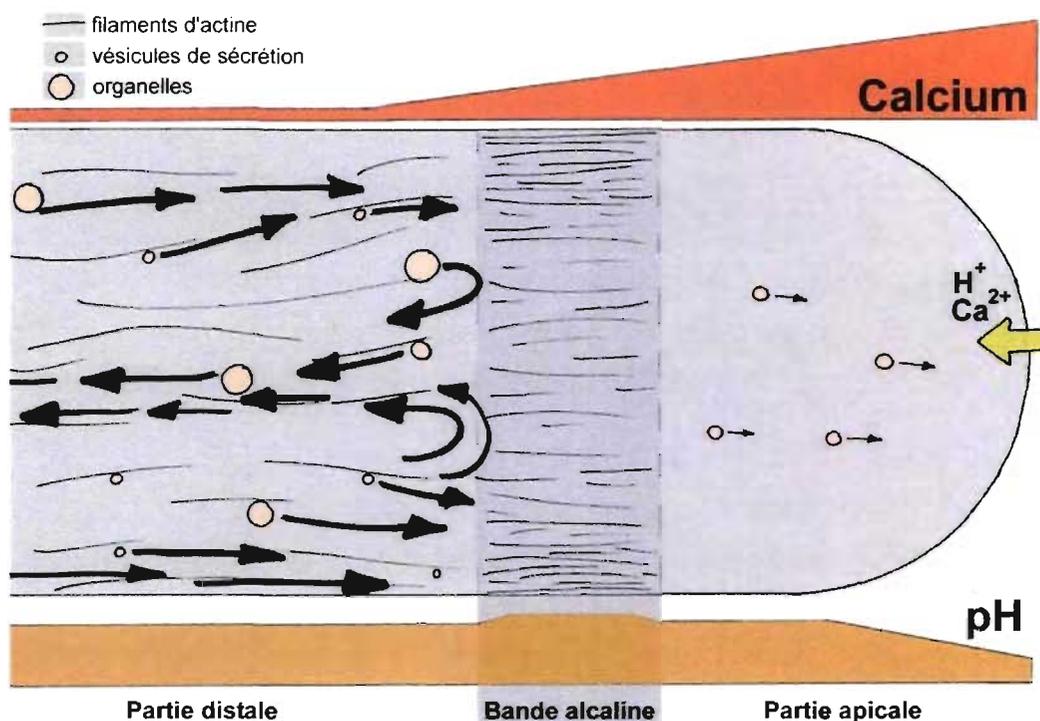
Étant l'enveloppe la plus externe de la cellule, la paroi joue elle aussi un grand rôle dans la croissance. Si elle n'a évidemment aucune fonction motrice, ses propriétés physiques sont cependant une contrainte à l'expansion cellulaire. Des études de la composition chimique de la paroi ainsi que des mesures de rigidité ont été effectuées. Ces deux types d'études ont montré des grandes différences entre la zone d'expansion du tube pollinique à l'apex et la partie distale (Geitmann et Parre 2004). De manière générale, la paroi des tubes polliniques d'angiospermes est composée d'une première couche composée de callose qui est recouverte par une deuxième couche qui elle est constituée de pectines, de cellulose et d'hémicellulose. Cependant cette répartition est différente à l'apex. La paroi apicale n'y contient pas de callose et très peu de cellulose. Par ailleurs les pectines à l'apex sont largement méthyl-estérifiées contrairement à la partie distale où elles sont peu méthyl-estérifiées (Geitmann et Steer 2006). L'ensemble de ces différences de composition à l'apex induit une plus grande souplesse de la paroi et permet ainsi la déformation et l'allongement de la cellule à cet endroit (Geitmann et Parre 2004; Jauh et Lord 1996;

Taylor et Hepler 1997). Il a également été montré que l'épaisseur de la paroi apicale oscille avec la même période que la vitesse de croissance, suggérant que les oscillations du taux de croissance pourraient être dues à des oscillations des propriétés physiques de la paroi (Holdaway-Clarke et Hepler 2003).

### *Ions, gradients et oscillations*

Si l'équilibre entre l'expansion de la membrane par exocytose, la pression de turgescence et les propriétés physiques de la paroi forment le modèle de base de la croissance apicale chez le tube pollinique, bien d'autres facteurs semblent indispensable au bon déroulement de ce processus. Parmi ceux-ci on trouve notamment les ions  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{H}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  et  $\text{K}^+$ . Les concentrations cytosoliques de ces ions oscillent avec la même période que le taux de croissance mais avec des phases décalées (Holdaway-Clarke et Hepler 2003), suggérant ainsi leur étroite relation avec les mécanismes de croissance.

Parmi ces ions, le calcium est certainement celui dont le rôle est le plus connu. Il a été montré qu'il y a un gradient de calcium dans l'apex du tube pollinique (Fig.1) depuis des valeurs de 3  $\mu\text{M}$  à l'apex (chez le lys) où a lieu l'entrée de calcium jusqu'à moins de 0.2  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{m}$  en arrière (Holdaway-Clarke et Hepler 2003; Taylor et Hepler 1997). La concentration de calcium à l'apex est critique pour la croissance du tube pollinique, parce qu'elle a un rôle dans l'exocytose, dans la régulation du flux cytoplasmique et du cytosquelette d'actine (voir plus bas). Le calcium pourrait aussi être un signal de guidance pour le tube pollinique, ainsi, il a été observé que les tubes polliniques tendent à se diriger en suivant un gradient de calcium vers la zone ayant la plus forte concentration. Ces réorientations des tubes seraient corrélées à la concentration apicale de calcium (Malhó et al. 2000; Malhó et al. 2006). Le calcium est également un médiateur de la réponse d'auto-incompatibilité de part son contrôle sur la croissance du tube pollinique (Thomas et al. 2003).



**Figure 1** : Schématisation du trafic intracellulaire, de l'exocytose et des gradients des ions  $H^+$  et  $Ca^{2+}$ . La bande alcaline colocalise avec le dense réseau d'actine sous-apicale. Les gros organelles font demi-tour au niveau de ce réseau (formant un mouvement de fontaine inversée), tandis que les vésicules de sécrétions vont jusqu'à l'apex. L'entrée des ions  $H^+$  et  $Ca^{2+}$  a lieu à l'apex créant ainsi un gradient de calcium et d'acidité. Les objets ne sont pas dessinés à l'échelle.

Le pH est un autre gradient lié étroitement à la croissance. Comme le calcium, le pH a un rôle dans la régulation du cytosquelette d'actine avec une hausse du pH correspondant à une augmentation du taux de polymérisation de l'actine (voir plus bas). Le pH cytosolique du tube pollinique est généralement légèrement acide (6.8 chez le lys) mais présente une caractéristique typique du tube pollinique : la bande alcaline (Fig.1). Cette région où le pH atteint une valeur de 7.5 (chez le lys) est située à la base de la zone claire et colocalise avec la fin du gradient de calcium, avec la zone de demi-tour des voies d'actine et avec le dense réseau d'actine sous apicale. Dans une période d'oscillations du taux de croissance, une hausse du pH précède un pic de la vitesse de croissance qui est suivit d'une

baisse du pH; ceci illustre là encore, la relation entre le pH et la croissance (Holdaway-Clarke et Hepler 2003; Lovy-Wheeler et al. 2006).

### **I.3 Le tube pollinique, du stigmate à l'ovule**

Si la plupart des protocoles d'études de la croissance du tube pollinique reposent sur des expériences *in vitro*, il est cependant essentiel de comprendre que ces expériences permettent de décrire un modèle de croissance simplifié où l'ensemble des signaux chimiques et des contraintes physiques du style est laissé de côté. Contrairement à d'autres cellules à croissance apicale telles que les poils racinaires et les hyphes fongiques, le tube pollinique doit, non seulement croître dans un tissu végétal, mais également trouver son chemin précisément jusqu'à l'entrée de l'ovule : le micropyle.

La pénétration de la surface du stigmate, puis la croissance dans le style requièrent l'action d'enzymes telles que la cutinase (Hiscock et al. 1994) combinée à l'application d'une force mécanique de percée. Chez les conifères il a également été montré que les cellules du style sont soumises à la mort programmée afin de faciliter le passage du tube pollinique (Hiratsuka et al. 2002). La force mécanique de percée sera amplement abordée plus bas.

La majorité des grains de pollen se posant sur le stigmate forment un tube pollinique et la majorité de ces tubes pénètrent la surface du stigmate et poussent à l'intérieur du style. Pourtant chaque sac embryonnaire est seulement atteint par un seul tube pollinique. La sélection se ferait une première fois dans l'étape allant du funicule jusqu'à l'extrémité du tégument puis, sur les quelques tubes restant une deuxième sélection aurait lieu dans la section allant du tégument jusqu'au sac embryonnaire afin qu'un seul tube atteigne le but (Sogo et Tobe 2006).

Comment l'ensemble de ces tubes polliniques est-il capable de trouver sa voie jusqu'à l'ovule? Cette question et les signaux chimiques qui y sont liés, ont beaucoup été étudiés mais peu d'information en ressort. Dans l'organe femelle, le grand nombre de cellules, leur importante variété ainsi que leur inaccessibilité rend l'identification des signaux chimiques difficile. Il a cependant été montré qu'il y a une hiérarchie de signaux commençant sur le stigmate et finissant au niveau de l'ovule (Lord 2003). Une ovule non fécondée émet des signaux attractifs tandis qu'une ovule fécondée diffuse, elle, des signaux répulsifs (Palanivelu et Preuss 2006). De plus des mutants d'ovules amènent un mauvais guidage des tubes polliniques (Herrero 2001). Ces signaux issus de l'ovule seraient essentiellement issus des synergides (Lord 2003). Sur le stigmate, des signaux de la famille des plantacyanines ont été caractérisés, notamment la chemocyanine chez le lys. Cette protéine est capable d'attirer les tubes polliniques *in vitro* (Dong et al. 2005; Kim et al. 2003).

Chez *Lilium*, qui est une espèce avec style creux, l'adhésion aux cellules du tissu transmissif est essentielle au guidage des tubes depuis le stigmate jusqu'à l'ovule. Certains composés nécessaires à cette adhésion ont été identifiés, parmi lesquels des pectines et des glycoprotéines. La protéine SCA (stigma/stylar cystein-rich adhesion) chez le lys a notamment été caractérisée par le laboratoire d'Elizabeth Lord (Jauh et Lord 1995; Lord 2001; Mollet et al. 2000). Les tubes polliniques adhèrent à la matrice extracellulaire au niveau de l'apex. Les tubes polliniques adhèrent également les uns avec les autres mais cette adhésion a lieu uniquement *in vivo* illustrant une fois de plus le rôle fondamental du tissu transmissif dans la croissance du tube pollinique (Jauh et al. 1997; Jauh et Lord 1996; Lennon et al. 1998; Sanders et Lord 1992).

#### **I.4 Introduction au cytosquelette**

Comme mentionné plus haut, la croissance du tube pollinique repose sur différents composants structuraux cellulaires. Parmi eux, le cytosquelette est une structure essentielle dont l'organisation et la polymérisation obéissent à des principes communs à l'ensemble des cellules végétales. La compréhension de la dynamique du cytosquelette chez une cellule telle que le tube pollinique nécessite cependant une bonne connaissance des différentes protéines et interactions présentes au sein de ce réseau afin de comprendre leurs rôles dans la croissance apicale.

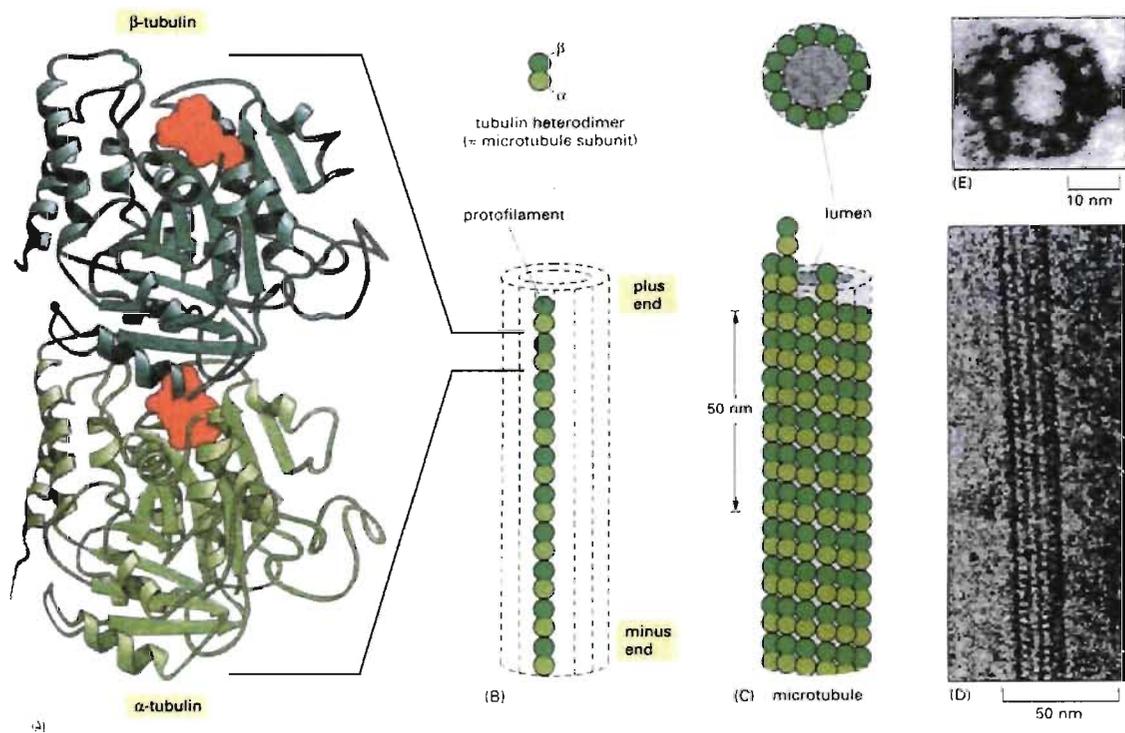
Le cytosquelette est composé de deux types de filaments (trois chez les métazoaires) formé par l'assemblage de deux (trois) familles de protéines. Il a de nombreux rôles qui sont indispensables à l'intégrité de la cellule, tels que : définir et maintenir l'organisation du cytosol et la forme de la surface cellulaire, permettre le mouvement des organelles, permettre la migration cellulaire et bien-sûr coordonner les différents processus de mitose.

Chez les plantes, le cytosquelette est formé par un réseau de microtubules et de filaments d'actine. Cette composition diffère de celles des métazoaires où l'on trouve, en plus, des filaments intermédiaires. Les fonctions de ces réseaux sont dépendantes des nombreuses protéines associées, telles que les ABP (actin binding proteins) et les MAP (microtubules associated proteins) ainsi que beaucoup d'autres protéines régulatrices et motrices (myosines pour les filaments d'actines, dynéines et kinésines pour les microtubules).

##### *Microtubules*

Les microtubules sont formés de l'assemblage de sous-unités de tubuline. Ces sous-unités sont des hétérodimères constitués d' $\alpha$ -tubuline et de  $\beta$ -tubuline (fig. 2). La

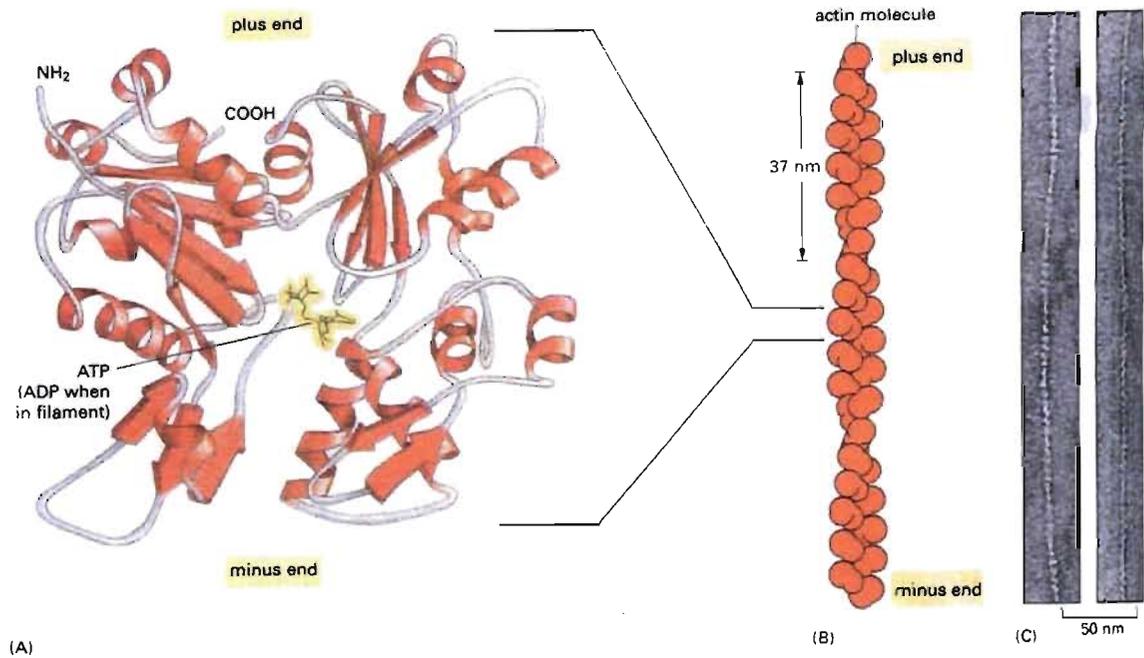
polymérisation des sous-unités de tubuline forment un protofilament. 13 protofilaments se regroupent parallèlement en un cylindre pour former un microtubule. L'extrémité du microtubule du côté des sous-unités  $\beta$  définit l'extrémité « plus » et celle du côté des sous-unités  $\alpha$ , l'extrémité « moins ». Au sein des hétérodimères, la sous-unité  $\alpha$  est liée constamment à un GTP, tandis que la sous-unité  $\beta$  est liée à un GTP ou un GDP. L'hydrolyse du GTP en GDP affecte négativement la solidité du lien entre deux sous-unités et régule ainsi la dynamique des microtubules.



**Figure 2 :** Modèle de polymérisation de la tubuline. A. Hétérodimère de tubuline  $\alpha$  et de tubuline  $\beta$ . B. Un protofilament. C. 13 Protofilaments placés en cylindre forment un microtubule. D. Un microtubule vu en microscopie électronique à transmission (MET). Figure issue de Alberts et al., 2002

### Filaments d'actine

Comme les microtubules, les filaments d'actine (actine F) sont issus de la polymérisation de sous-unités. Ces sous-unités sont des monomères d'actine G (actine globulaire). Quand l'actine F se dépolymérise, elle passe alors sous forme de monomères isolés d'actine dite globulaire (actine G). L'actine G est liée à un ATP qui est hydrolysé en ADP quand le monomère fait partie d'un filament (actine F) (fig. 3). L'assemblage des monomères d'actine forment un filament polarisé (avec une extrémité « plus » et une extrémité « moins») et deux filaments se rassemblent parallèlement pour former une hélice, elle aussi polarisée.



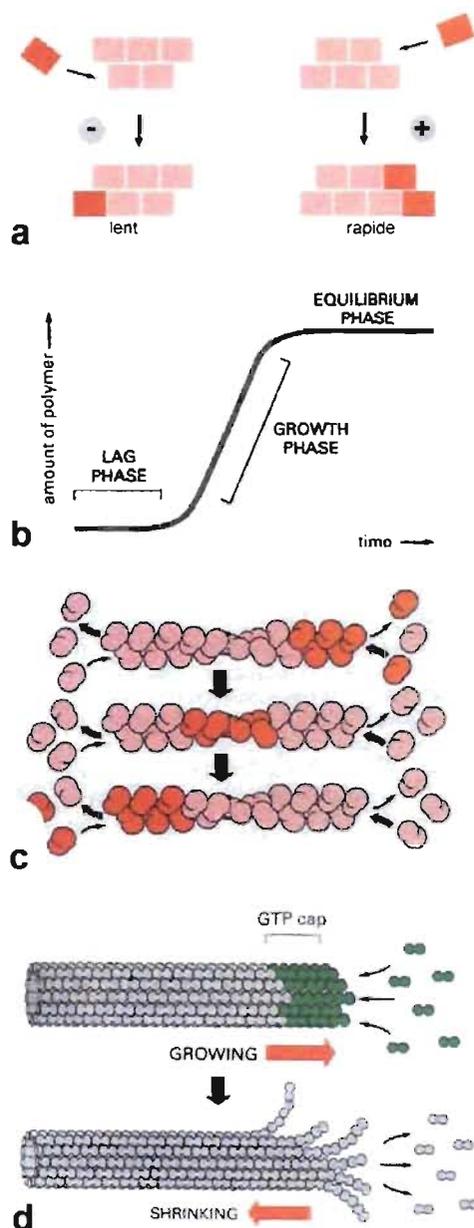
**Figure 3 :** Modèle de polymérisation de l'actine. A. Monomère d'actine G. B. Les filaments d'actine sont regroupés par deux et forment une hélice. C. Filament d'actine vu en microscopie électronique à transmission (MET). Figure issue de Alberts et al., 2002

### *Dynamique du cytosquelette*

Que ce soit chez les microfilaments d'actine ou chez les microtubules, les deux extrémités d'un filament du cytosquelette ne polymérisent pas à la même vitesse. Les filaments sont polarisés. On définit l'extrémité se polymérisant le plus rapidement comme l'extrémité « plus » et celle se polymérisant plus lentement comme l'extrémité « moins » (fig. 4.a).

La dynamique de polymérisation des filaments du cytosquelette suit la courbe classique de polymérisation des protéines (fig. 4.b). La phase de croissance rapide (growth phase) est précédée par une phase de nucléation (lag phase). Durant cette période un noyau se forme et sert de base à la polymérisation du filament. Chez les filaments d'actine ce noyau est composé d'un trimère d'actine, tandis que chez les microtubules la structure est plus complexe et serait probablement composée de treize sous-unités de tubuline disposées en anneau pour supporter le futur cylindre de treize protofilaments. *In vivo*, ce cylindre est initié à partir d'une base formée d'un complexe protéique contenant la protéine  $\gamma$ -tubuline. Quand les filaments ont atteint leur taille maximale, la phase de croissance rapide cesse et les filaments sont alors dans un état d'équilibre. Cet état est atteint quand il y a une balance entre la polymérisation (élongation) et la dépolymérisation (rétrécissement).

Une autre caractéristique du dynamisme des filaments d'actine et des microtubules est le processus de « treadmilling » (fig. 4.c). Les filaments gardent une longueur constante, mais les sous-unités se déplacent le long des filaments. Ce processus est dû à un taux de polymérisation élevé à l'extrémité plus et faible à l'extrémité moins, et à un taux de dépolymérisation faible à l'extrémité plus et élevé à l'extrémité moins.



**Figure 4** : Dynamique du cytosquelette. A. La polymérisation de l'actine est plus rapide à l'extrémité plus qu'à l'extrémité moins. B. Modèle général de polymérisation des monomères. La courbe décrit trois phases, une phase de latence, suivit d'une phase de croissance rapide et finalement un état d'équilibre. C. processus de « treadmilling » chez les filaments d'actine. D. Processus d'instabilité dynamique chez les microtubules. A. Inspiré de Alberts et al., 2002; B,C,D issus de Alberts et al., 2002.

Les filaments du cytosquelette sont soumis à une alternance rapide entre des périodes de croissance et de rétrécissement. Ce phénomène est appelé « instabilité dynamique » (fig. 4.d) et est contrôlé principalement par les « caps » de GTP (microtubules) et d'ATP (microfilaments d'actine). Chez les microtubules, la présence d'un cap de GTP favorise la croissance tandis que la perte de ce « cap » cause le rétrécissement des protofilaments par dépolymérisation.

Actuellement on pense que le processus de « treadmilling » est caractéristique des filaments d'actine plutôt que des microtubules, alors qu'à l'inverse, l'instabilité dynamique serait-elle caractéristique des microtubules. Ces deux processus assurent constamment la dynamique des sous-unités au sein des filaments du cytosquelette même si la longueur approximative de ces filaments n'est pas affectée.

### *Le cytosquelette de la cellule végétale*

Le rôle du cytosquelette dans la cellule végétale est moins connu que dans la cellule animale. Cette lacune est notamment due au faible nombre de ABPs et MAPs caractérisés chez les plantes ainsi qu'à la présence de la paroi. Le grand rôle joué par la paroi dans

l'architecture de la cellule végétale, rend l'étude des fonctions structurelles du cytosquelette plus difficile. Il est cependant bien établi que le cytosquelette assure comme chez les cellules animales des rôles de transport intracellulaire (notamment grâce aux myosines, dyneines, kinesines) et d'organisation du cytosol (Holweg 2006).

Les microtubules sont localisés principalement dans le cortex de la cellule ainsi que, durant la mitose, dans la bande préprophasique, dans l'appareil mitotique, et dans le phragmoplaste dont ils permettent la mise en place (Hepler et al. 1993). Les microtubules sont impliqués dans la croissance polarisée des cellules végétales durant la morphogénèse, comme le montre la perte de polarité qui suit la dégradation des microtubules chez les trichomes d'*Arabidopsis thaliana* (Szymanski 2001). Ils ont, en outre, un rôle dans l'orientation des microfibrilles de cellulose présentes dans la paroi cellulaire (Baskin 2001).

Les filaments d'actine sont, eux, situés aussi bien dans le cortex cellulaire que dans le cytoplasme. Durant la mitose, ils sont également dans la bande préprophasique et dans le phragmoplaste (Hepler et al. 1993). Chez les plantes, le réseau d'actine est régulé par de nombreuses ABPs déjà identifiées chez les plantes telles que l' $\alpha$ -actinine, les protéines de type intégrine, les cofilines, l'ADF (actine depolymerizing factor), les profilines et les formines. Ces protéines peuvent être soit des protéines de liaison qui permettent l'ancrage du réseau ou la formation de faisceaux ( $\alpha$ -actinine, profiline) soit des protéines régulant la polymérisation et la segmentation du réseau d'actine (ADF, cofilines) soit les deux (intégrines, formines) (Baluska et al. 2000; Chen et al. 2002; Papp et al. 2006; Pelletier et al. 2003).

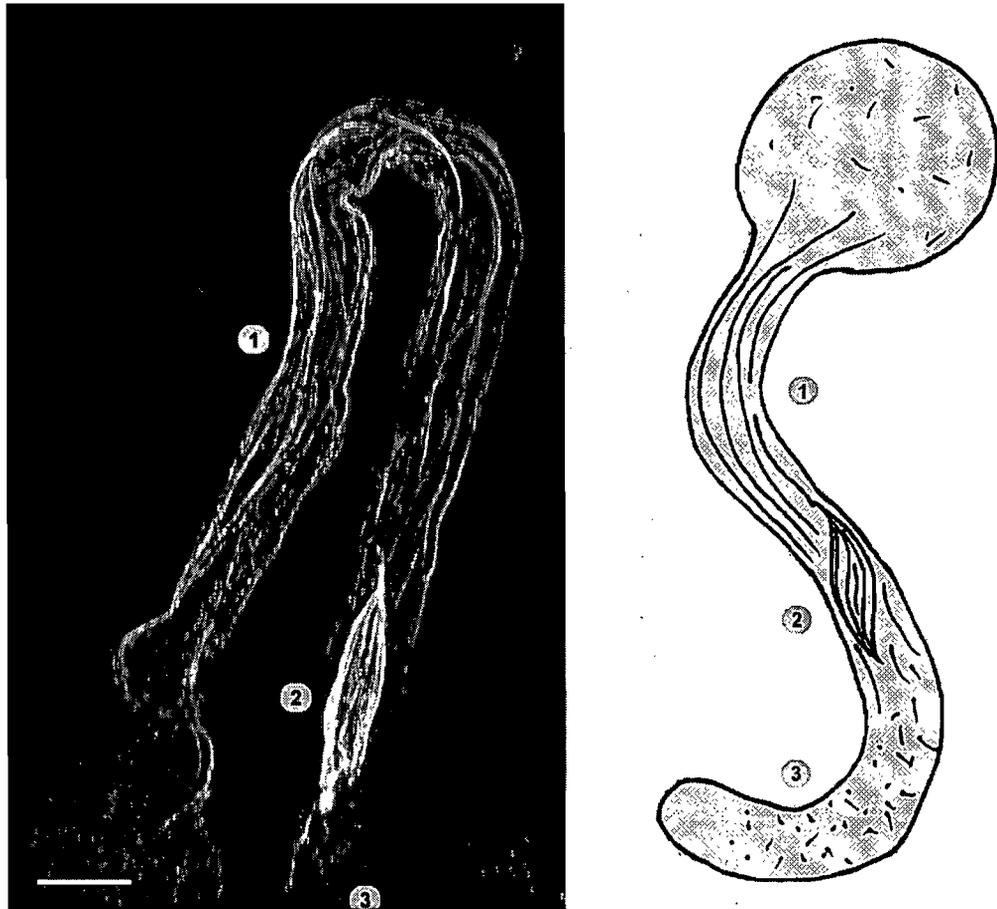
Outre la régulation des microtubules et des filaments d'actine par les MAPs et les ABPs respectivement, les deux composantes du cytosquelette semblent dépendantes l'une de l'autre. Cette observation a été faite aussi bien chez les animaux (Aspengren et al. 2006; Hasaka et al. 2004) que chez les plantes (Collings et al. 1998; Collings et al. 2006).

### **I.5 Le cytosquelette du tube pollinique**

Le cytosquelette chez le tube pollinique, si on le compare à celui des autres types cellulaires qui composent la plante, possède une organisation atypique qui se retrouve uniquement chez d'autres sortes de cellules à croissance apicale telles que les poils racinaires, ou les hyphes fongiques. Cette organisation particulière illustre le rôle fondamental du cytosquelette dans le processus de croissance apicale.

#### *Organisation des microtubules*

Les microtubules s'étendent depuis le grain de pollen jusqu'à la partie subapicale du tube pollinique. Ce réseau continu est constitué de faisceaux orientés axialement, d'abord fins, qui s'épaississent suite à la migration de la cellule générative (fig. 5) (Laitinen et al. 2002; Lazzaro 1999). La présence de microtubules à l'apex du tube pollinique est actuellement discutable, les méthodes de visualisation de la tubuline étant peu efficaces en partie apicale. On suppose cependant que les microtubules s'étendraient jusqu'à une section très proche de l'apex mais que l'apex serait lui dénué de microtubules (Laitinen et al. 2002; Taylor et Hepler 1997). Une caractéristique du cytosquelette de microtubules est la structure en forme de cage située à la périphérie de la cellule générative. Cette cage est formé de 5 à 15 microtubules chez *Nicotiana tabacum* (Del Casino et al. 1992; Theunis et al. 1992).

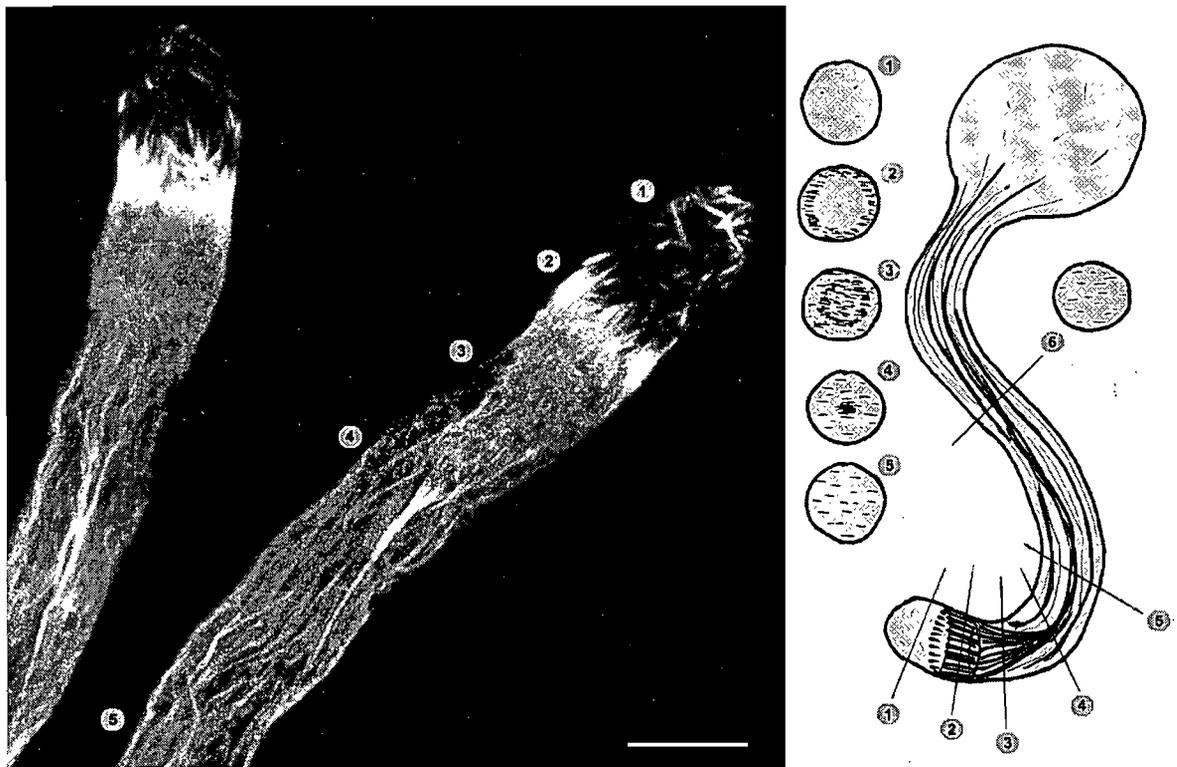


**Figure 5 :** Organisation des microtubules chez les tubes polliniques de *Papaver rhoeas*. 1. Partie distale du tube pollinique, les microtubules sont longs et axiaux. 2. Cellule générative contenue dans une « cage » de microtubules. 3. section située au-delà de la cellule générative. Seuls des fragments de microtubules sont visibles et leur orientation est aléatoire. L'apex du tube ne contient généralement pas de microtubules. Barre=8 $\mu$ m.

### *Organisation des filaments d'actine*

L'actine est organisée en un réseau axial, aussi bien cortical que cytoplasmique, et qui s'étend depuis le grain de pollen jusqu'en partie sous-apicale du tube pollinique (fig. 6) (Jackson et Heath 1993; Raudaskoski et al. 2001; Vidali et Hepler 2001). Les méthodes de visualisation révèlent un réseau d'actine bien plus dense que celui de microtubules tout au

long du tube. La section située directement sous l'apex est cependant encore plus dense que le reste du réseau. L'apex, lui, ne possède pas de faisceaux d'actine mais un « pool » d'actine G et probablement de courts filaments d'actine (Geitmann et Emons 2000; Li et al. 2001; Miller et al. 1996) Cette caractéristique est cependant discutée car les méthodes de visualisation sont, là encore, limitées dans cette partie du tube (Miller et al. 1999; Wang et al. 2005).



**Figure 6 :** Organisation des filaments d'actine. 1. L'apex contient seulement de courts fragments d'actine F. 2. La région sous-apicale forme un réseau très dense d'actine qui à généralement la forme d'un cylindre cortical. 3,4. ce cylindre est suivi d'un cône d'actine qui assure la transition entre l'actine corticale et un faisceau central de microfilaments. 5. L'actine en partie distale est aussi bien corticale que centrale. Barre=8 $\mu$ m.

Parmi les caractéristiques du cytosquelette d'actine, le réseau particulièrement dense situé sous l'apex est la structure pour laquelle le plus d'efforts ont été faits afin d'en comprendre l'organisation. Il a d'abord été suggéré que cette structure était formée d'un réseau de filaments ayant des orientations aléatoires (Foissner et al. 2002; Vidali et Hepler 2001) formant ainsi un maillage dense qui isolerait le cytoplasme apical du reste du cytoplasme. Il a cependant été montré récemment que cette partie du cytosquelette aurait une organisation réelle avec de faisceaux d'actine orientés axialement comme dans le reste du tube (fig. 6). Ces faisceaux axiaux s'étendraient sur une distance de 5 à 10 $\mu$ m (chez le lys) et serait situés uniquement dans le cortex; formant ainsi un cylindre cortical d'actine situé à une distance de 1 à 5 $\mu$ m en arrière de l'apex (Lovy-Wheeler et al. 2005).

#### *Le rôle des microtubules*

L'utilisation de drogues affectant la polymérisation des microtubules telles que l'orysaline a permis l'étude du rôle des microtubules dans les cellules végétales. Chez les tubes polliniques et les hyphes, quelques fonctions ont déjà été décrites; les microtubules déterminent la forme de la cellule générative et des vacuoles et permettent leur transport vers l'apex, ils seraient également impliqués dans l'organisation du cytoplasme et le transport du noyau végétatif (Del Casino et al. 1993; Hyde et al. 1999; Laitinen et al. 2002; Raudaskoski et al. 2001). L'utilisation d'orysaline, comme d'autres drogues affectant les microtubules telles que le taxol ou la colchicine, provoque la perte des oscillations de croissance chez les tubes polliniques de tabac, suggérant un rôle direct dans le processus de croissance apicale (Cai et al. 2001; Geitmann et Cresti 1996).

### *Le rôle des filaments d'actine*

Il a été admis très tôt que l'intégrité du cytosquelette d'actine est indispensable à la croissance du tube pollinique, car les vésicules de sécrétion nécessaires à l'expansion membranaire voyagent le long des voies d'actine. Ainsi, l'immobilisation des myosines avec une drogue telle que la 2,3-butanedione monoxime supprime la croissance apicale. Si les filaments d'actine sont indispensables au flux cytoplasmique (Lancelle et al. 1987), leur dégradation avec la latrunculine B ou la cytochalasine D inhibe la croissance du tube pollinique à une concentration moindre que celle affectant le courant cytoplasmique. Cette observation suggère que, outre leur rôle dans le transport vésiculaire, les filaments d'actine aurait une action directe sur la croissance apicale (Gibbon et al. 1999; Raudaskoski et al. 2001; Vidali et al. 2001).

Le rôle du dense réseau d'actine sous apical est, lui, moins clair. Il a été suggéré que ce serait le point de demi-tour des voies d'actine et que les faisceaux seraient à cet endroit étroitement associés à la membrane plasmique. La polymérisation de l'actine dans cette section permettrait, elle, le demi-tour du flux vésiculaire vers la partie distale du tube pollinique (Cardenas et al. 2005). Une autre hypothèse serait que l'actine sous-apicale pourrait diriger les vésicules à l'apex et également maintenir l'organisation du cytoplasme apical (Fu et al. 2001).

La forte instabilité de l'actine F en partie apicale et le fort taux de polymérisation des filaments qui en résulte seraient par ailleurs un aspect indispensable à la croissance apicale. La localisation de ce phénomène directement sous l'apex permettraient de déterminer le lieu de l'exocytose des vésicules et donc de l'expansion membranaire (Ketelaar et al., 2003). Finalement, l'absence d'actine en partie apicale pourrait elle aussi être indispensable à l'exocytose. Il a ainsi été observé chez les animaux que la présence d'un réseau dense d'actine agirait comme rempart à l'exocytose (Yoneda et al. 2000). Ce concept de barrière formée par les filaments d'actine a également été décrit récemment

chez les cellules végétales. Des régions contenant des réseaux fins d'actine pourraient s'accroître rapidement tandis que celles ayant des réseaux denses d'actine auraient un mauvais trafic vésiculaire et donc un faible taux de croissance (Mathur 2005).

### *Protéines de liaisons au cytosquelette, gradients ioniques et interactions*

L'étude du cytosquelette chez le tube pollinique ne peut-être envisagée sans la compréhension des facteurs qui influencent son organisation, sa polymérisation et sa dépolymérisation. Certaines familles de protéines de liaisons au cytosquelette ont été caractérisées récemment chez le pollen, particulièrement des ABPs. L'action de ces protéines est généralement liés aux gradients ioniques présents dans le tube pollinique tels que ceux des ions  $H^+$  et  $Ca^{2+}$ .

ADF (Actin depolymerizing factor) et cofiline : Ces deux protéines sont des ABPs qui segmentent les filaments d'actine et les dépolymérisent à leur extrémité « moins ». L'activité de segmentation de l'ADF et celle de dépolymérisation de la cofiline sont dépendantes du pH. À l'inverse, l'activité de segmentation de la cofiline en est, elle, indépendante (Chen et al. 2002; Pavlov et al. 2006). Dans le modèle couramment décrit où le taux de croissance du tube pollinique oscille, il a été rapporté que le pH dans la bande alcaline oscille lui aussi (Holdaway-Clarke et Hepler 2003). Une hausse du pH dans cette section stimulerait l'activité de segmentation de l'ADF, ce qui amènerait plus de sites de polymérisation de l'actine et donc un plus fort taux de croissance. La polymérisation de l'actine provoquerait par la suite l'entrée de protons et donc l'inactivation de l'ADF, réduisant ainsi la polymérisation de l'actine et donc le taux de croissance (Lovy-Wheeler et al. 2006). De la même manière, la segmentation des filaments d'actine par la cofiline

permet la croissance car elle augmente le nombre d'extrémités libres et donc le nombre de site de polymérisation (Pavlov et al. 2006).

Le cytosquelette d'actine est dépendant du pH du fait de l'action d'ABPs telles que l'ADF et la cofiline. Cette observation est renforcée par la colocalisation du réseau très dynamique d'actine sous-apicale et de la bande alcaline, ainsi que par les oscillations du cytosquelette d'actine visibles par marquage à la GFP-taline (Holdaway-Clarke et Hepler 2003).

Profiline et villine : Ces deux ABPs sont dépendantes du calcium. La villine fragmente les filaments d'actine en partie apicale où la concentration de  $Ca^{2+}$  est élevée assurant ainsi une section sans actine à l'apex. A l'inverse, en partie distale où la concentration de  $Ca^{2+}$  est basale, la villine pourrait agir comme un cross-linker et ainsi stabiliser les faisceaux d'actine (Holdaway-Clarke et Hepler 2003). La haute concentration de  $Ca^{2+}$  dans l'apex stimule également l'action de la profiline qui séquestre ainsi l'actine G, empêchant là encore la polymérisation de l'actine en partie apicale (Holdaway-Clarke et Hepler 2003). Comme la villine, la profiline pourrait aussi avoir un rôle dans l'assemblage en faisceaux des filaments d'actine, comme cela a été observé chez les poils racinaires (Baluska et al. 2000).

D'autres familles d'ABPs ont été décrites dans les tubes polliniques et les hyphes fongiques, parmi lesquelles les formines (généralement liées à la membrane et qui induisent la polymérisation des filaments), l' $\alpha$ -actinine (qui assurent la liaison filaments d'actine/paroi), les « intégrines-like » (caractérisées récemment chez le pollen, elles assurent les interactions cytosquelette d'actine/matrice extracellulaire du style et cytosquelette d'actine/paroi; elles sont localisées principalement à l'apex), les myosines (elles assurent le transport des organelles et des vésicules le long des microfilaments; elles sont inhibées par une forte concentration de calcium telle que celle de l'apex) (Chen et al.

2002; Holdaway-Clarke et Hepler 2003; Kaminskyj et Heath 1995; Li et Yen 2001; Sun et al. 2000).

MAPs (microtubules associated proteins): Des MAPs de la famille des dynéines et des kinésines ont été identifiées dans les tubes polliniques. Comme les myosines liées aux filaments d'actines, ces protéines sont des moteurs qui permettent le transport des vésicules et des organelles le long des microtubules (Cai et al. 2001). D'autres protéines de la famille des MAPs ont été identifiées et pourraient permettre la liaison microtubules/paroi (Cai et al. 2005). Par ailleurs, les microtubules sont eux aussi régulés par la concentration de  $Ca^{2+}$ , (une forte concentration empêcherait la polymérisation) ce qui corrèle avec leur absence supposée de la partie apicale (telle qu'observée par immuno-marquage) (Raudaskoski et al. 2001).

## **I.6 Biomécanique et force de croissance cellulaire**

### *Généralités sur la biomécanique*

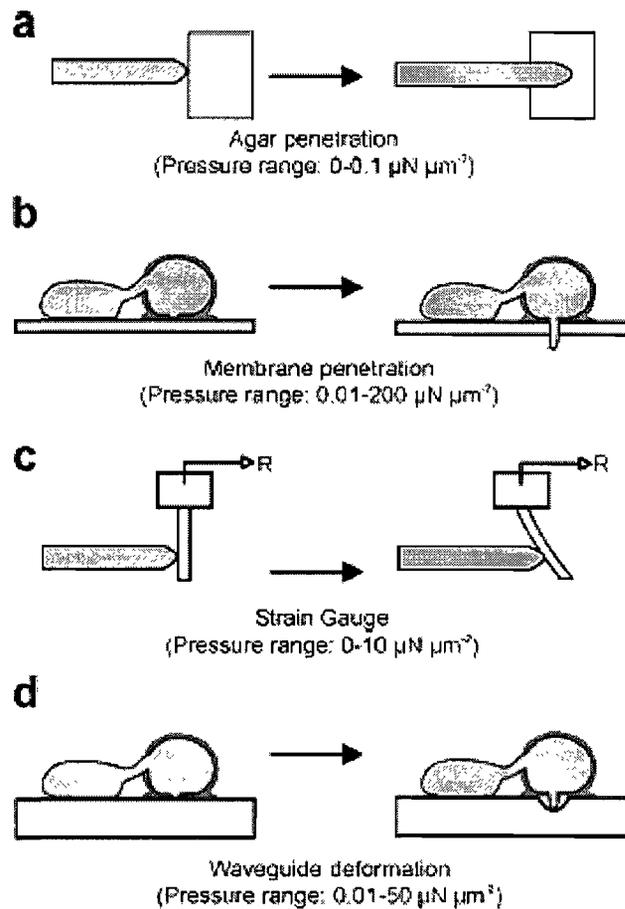
Notre objectif dans le cadre de ma maîtrise était d'étudier le rôle mécanique du cytosquelette dans la croissance du tube pollinique. Nous avons donc utilisé, en plus des drogues et de la microscopie, une approche biomécanique de l'étude de la croissance apicale.

La biomécanique à l'échelle cellulaire correspond à l'étude des propriétés physiques des cellules et de leur composants macromoléculaires (Geitmann 2006). Des caractéristiques globales telles que la forme, la rigidité ou la résistance aux forces extérieures sont étudiées dans le contexte général de la fonction de la cellule au sein de l'organisme entier. Ces caractéristiques physiques sont mises en relation avec les

composants intra-cellulaires qui sont susceptibles de les influencer, tels que la pression interne de la cellule, la composition chimique et l'architecture de la paroi ou encore le cytosquelette.

Ce type d'approche est particulièrement pertinent pour l'étude de la croissance du tube pollinique. La plupart des cellules à croissance apicale doivent pénétrer un environnement (sol, hôte, stigmate...), elles doivent donc résister à d'importantes forces issues du milieu extérieur et fournir elles-mêmes une force nécessaire à la pénétration de cet environnement (Geitmann et Emons 2000; Money 1998). De plus, certains types de cellules, dont notamment les tubes polliniques et les hyphes fongiques doivent, avant de croître dans le tissu hôte, traverser une interface air/tissu ou sol/tissu. Cette première percée de la surface de la plante nécessite l'intervention d'une importante force mécanique, qui, si elle a été beaucoup étudiée chez les hyphes, n'a pas encore fait l'objet d'études approfondies chez le pollen.

Beaucoup de recherches dans le domaine de la biomécanique végétale au niveau cellulaire reposent sur l'étude de la pression de turgescence. Des techniques de mesure de cette pression et des forces qui en résultent ont été mises au point; particulièrement chez les hyphes (Bastmeyer et al. 2002) (fig. 7). Parmi ces approches on trouve l'évaluation de la pression par plasmolyse ou la mesure directe par « pressure probe » (Benkert et al. 1997). Des mesures directes de la force sont aussi possibles grâce à des méthodes telles que la « waveguide microscopy » ou encore l'utilisation de la « silicon strain gauge » (Bastmeyer et al. 2002). Dans cette dernière méthode, la force exercée par la cellule sur un levier en silicone est mesurée de manière directe (avec une précision au  $\mu\text{N}$ ) en fonction de la déformation de ce levier. D'autres méthodes reposant sur des expériences de pénétration d'agar ou de membrane permettent d'évaluer de manière indirecte cette force (Bastmeyer et al. 2002; Bechinger et al. 1999; Ravishankar et al. 2001) (fig. 7).



**Figure 7** : Méthode de mesures directes et indirectes de la force de croissance chez les hyphes fongiques. A,B. Évaluations indirectes par pénétration de milieu d'agarose ou de membranes. C,D. Mesures directes par l'utilisation de la « strain gauge » ou par « waveguide microscopy ». Figure issue de Bastmeyer et al., 2002.

Si la pression de turgescence influence de manière dramatique l'expansion de la cellule, la paroi est un facteur limitant dont l'élargissement cellulaire dépend en grande partie. Du fait de la présence ou non de paroi, les cellules végétales et animales ont un mode d'expansion très différent. Les cellules animales grandissent uniquement grâce à une expansion de la membrane plasmique poussé par le cytosquelette, tandis que les cellules

végétales sont, elles, enfermées dans une paroi rigide dont les propriétés physiques contrôlent le taux de croissance (Schopfer 2006). Des mesures de rigidité de la cellule par des techniques de micro-indentation, comme effectuées chez les tubes polliniques, combinées à des études des propriétés chimiques de la paroi, peuvent donc fournir plus d'informations sur le rôle de la paroi dans la rigidité et dans l'expansion de la cellule (Geitmann et Parre 2004).

#### *Force de percée chez les hyphes fongiques*

La pénétration de l'hôte chez les hyphes repose à la fois sur l'action d'enzymes qui digèrent les parois du tissu hôte et sur une force mécanique de pression afin de percer la cuticule (Bastmeyer et al. 2002; Roustae et al. 2000; Talbot 1999). Pour fournir cette force, les hyphes forment une structure appelée appressorium qui adhère fortement à la surface de l'hôte. De cette structure sort une excroissance de percée dirigée perpendiculairement à la surface de l'hôte, assurant ainsi une plus grande efficacité pour la pénétration de la cuticule. La force fournie par l'appressorium est généralement de l'ordre de 12  $\mu\text{N}$  mais peut atteindre 100  $\mu\text{N}$  (Bechinger et al. 1999; MacDonald et al. 2002; Money 2001). Si les tubes polliniques ne forment pas d'appressoria, de nombreux parallèles peuvent cependant être faits entre les mécanismes de percée des hyphes et des tubes polliniques. Le stigmate possède généralement des papilles couvertes de cuticule qui forment un obstacle au passage du tube pollinique. La percée de la surface du stigmate repose en partie sur une force mécanique et en partie sur l'action d'enzymes de digestion telles que la cutinase (Hiscock et al. 1994) ou la xylanase (Suen et Huang 2007).

## **I.7 Croissance apicale : de nouveaux rôles pour le cytosquelette**

### *Force de croissance*

Durant les dernières années de nouveaux résultats obtenus chez les hyphes fongiques contestent le rôle unique et bien établi de la turgescence comme unique moteur de la croissance apicale (Bastmeyer et al. 2002; Money et Harold 1992). Chez les hyphes, le cytosquelette pourrait fournir comme chez les cellules animales ou les levures, une force suffisante à l'expansion cellulaire assurant ainsi la croissance observée chez les hyphes ayant une pression négligeable (Money 1997; Money 1998; Pickett-Heaps et Klein 1998; Talbot 1999). Il est également intéressant de noter que la turgescence n'est pas corrélée de manière linéaire aux taux de croissance ce qui suggère l'intervention d'un ou de plusieurs autres acteurs dans l'expansion cellulaire (Benkert et al. 1997; Kaminskyj et al. 1992). Des rôles mécaniques du cytosquelette (notamment l'actine) ont déjà été décrits dans des structures telles que les filopodes, lamellipodes, les microvillosités ou encore les cellules musculaires. Les filaments d'actine sont également indispensables à la migration de nombreux types cellulaires animales. Dans toutes ces fonctions de nombreuses ABPs sont nécessaires aux processus d'adhésion et de contraction (Alberts et al. 2002).

Des hypothèses similaires ont également été émises chez le tube pollinique. La polymérisation de l'actine pourrait fournir une force suffisante à la croissance apicale. Ainsi la croissance est 2 à 6 fois plus sensible que le flux vésiculaire à l'action des drogues dégradant les filaments d'actine. Ceci suggère que les filaments d'actine participent directement à la croissance (Vidali et al. 2001). Il est actuellement difficile de déterminer la manière dont l'actine influence la force de croissance du fait de l'action nettement supérieure de la turgescence dans ce processus.

### *Maintien de la forme de la cellule et résistance à la pression*

En utilisant la latrunculine B et la cytochalasine D sur des fibroblastes et en mesurant leur rigidité et leur force de contraction, il a été observé que les propriétés mécaniques des cellules et des tissus dépendent beaucoup du degré de polymérisation de l'actine (Wakatsuki et al. 2001). L'actine et ses cross-linkers y formeraient une coquille corticale résistante qui déterminerait en grande partie la structure de la cellule animale (Ananthkrishnan et al. 2006). Un modèle similaire pourrait s'appliquer au tube pollinique. Le dense réseau cortical d'actine sous-apicale pourrait, à l'instar de la paroi, permettre la résistance à la pression de turgescence à l'apex et/ou aux forces externes (Taylor et Hepler 1997).

### *Direction de croissance*

Si la force de croissance est indispensable au tube pollinique lors de la pénétration d'obstacles ou de l'élongation dans un milieu tel que le tissu transmissif du style, il est également primordial que le tube puisse déterminer et maintenir sa direction de croissance afin de trouver son chemin jusqu'à l'ovule et garder une direction cohérente même en présence de pressions extérieures ou d'obstacles. Si aucune information sur le rôle du cytosquelette dans la direction de croissance n'est pour l'instant disponible chez les tubes polliniques, il existe plus d'informations chez d'autres modèles cellulaires à croissance apicale. Chez les hyphes, des inhibiteurs des microtubules causent la perte de la direction de croissance, tandis que l'inhibition des filaments d'actine n'a, elle, aucun effet (Riquelme et al. 1998). Chez les poils racinaires, la dépolymérisation des microtubules par l'orysaline utilisée en combinaison avec la cytochalasine D provoque là encore une altération de la direction de croissance (Ketelaar et al. 2003). Nous avons donc souhaité étudier cet aspect chez les tubes polliniques et mettre les données obtenues en relation avec la force de

croissance afin de comprendre le mécanisme nécessaire à la percée d'un obstacle tel que le stigmate.

## **I.8 Objectifs et motivation**

De part ses propriétés et son environnement de croissance, le tube pollinique est un modèle très pertinent pour des études biomécaniques de la croissance cellulaire. Cependant, à l'exception des informations liées aux propriétés physiques de la paroi (Geitmann 1999; Geitmann et Parre 2004) et de quelques études sur le rôle de la pression de turgescence (Benkert et al. 1997; Zonia et al. 2006), peu d'informations quantitatives sont disponibles dans ce domaine chez le tube pollinique.

Nous avons choisi comme espèce modèle *Papaver rhoeas* du fait de sa grande rapidité de croissance et de son fort taux de germination. Nous nous sommes intéressés aux rôles physiques du cytosquelette chez les tubes polliniques de cette espèce, c'est-à-dire les rôles influençant la force et la direction de croissance, ainsi que la forme de la cellule. Dans le contexte actuel de la controverse sur le rôle omnipotent de la turgescence comme moteur de la croissance apicale, il était particulièrement intéressant de tester si le cytosquelette pouvait jouer un rôle dans ce processus. Comme la capacité à pénétrer un obstacle est dépendante du maintien de la direction de croissance, nous avons aussi testé d'éventuelles relations entre l'intégrité du cytosquelette et les changements de direction des tubes polliniques. Il est souvent très instructif de lier les rôles du cytosquelette à l'organisation des filaments, particulièrement quand ils forment des structures particulières telles que le cylindre d'actine sous-apicale. Ces observations peuvent permettre de comprendre les mécanismes qui sont derrière les résultats observés. Nous avons donc dans un premier temps cherché à optimiser les méthodes de visualisation du cytosquelette, afin d'obtenir des images claires et comprendre l'ensemble des artéfacts liés aux composés de fixation et de marquage, et ainsi les prendre en compte lors de l'interprétation des images obtenues.

## **I.9 Approches et stratégies**

Une des façons les plus efficaces d'étudier les rôles du cytosquelette au sein de la cellule est d'en altérer l'intégrité et l'état de polymérisation. Tout au long de cette série d'études nous avons donc fait appel à l'utilisation de drogues inhibant la polymérisation du cytosquelette. Nous avons privilégié l'utilisation de drogues inhibitrices à celle de drogues qui induisent la polymérisation, car il est plus facile de caractériser les effets d'un cytosquelette non fonctionnel plutôt que ceux d'un cytosquelette « sur-développé » par des agents polymérisants. Nous avons combiné l'utilisation de ces drogues avec différents tests et marqueurs. Parmi les expériences réalisées, des tests mécaniques ont été développés. Ils sont basés sur l'utilisation de milieux de croissance solidifiés avec de l'agarose qui nécessitent que les tubes polliniques fournissent une force de croissance afin de pouvoir y croître. D'autres tests basés sur l'observation directe de l'effet des drogues sur le taux de germination et de croissance ainsi que sur l'organisation des filaments d'actine et des microtubules ont aussi été réalisées.

Que ce soit pour les tests mécaniques, pour les tests de germination ou pour du marquage du cytosquelette, la microscopie optique a été l'outil principal d'observation de nos résultats.

## **Références**

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002) Molecular biology of the cell. Garland Science, New York.

Ananthakrishnan R, Guck J, Wottawah F, Schinkinger S, Lincoln B, Romeyke M, Moon T, Kas J (2006) Quantifying the contribution of actin networks to the elastic strength of fibroblasts. *Journal of Theoretical Biology* 242: 502-516.

Aspengren S, Wielbass L, Wallin M (2006) Effects of acrylamide, latrunculin, and nocodazole on intracellular transport and cytoskeletal organization in melanophores. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 63: 423-436.

Baluška F, Šalaj J, Mathur J, Braun M, Jasper F, Šamaj J, Chua NH, Barlow PW, Volkmann D (2000) Root hair formation: F-actin-dependent tip growth is initiated by local assembly of profilin-supported F-actin meshworks accumulated within expansin-enriched bulges. *Developmental Biology* 227: 618-632.

Baskin TI (2001) On the alignment of cellulose microfibrils by cortical microtubules: a review and a model. *Protoplasma* 215: 150-171.

Bastmeyer M, Deising HB, Bechinger C (2002) Force exertion in fungal infection. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 31: 321-341.

Bechinger C, Giebel KF, Schnell M, Leiderer P, Deising HB, Bastmeyer M (1999) Optical measurements of invasive forces exerted by appressoria of a plant pathogenic fungus. *Science* 285: 1896-1899.

Benkert R, Obermeyer G, Bentrup FW (1997) The turgor pressure of growing lily pollen tubes. *Protoplasma* 198: 1-8.

Cai G, Ovidi E, Romagnoli S, Vantard M, Cresti M, Tiezzi A (2005) Identification and characterization of plasma membrane proteins that bind to microtubules in pollen tubes and generative cells of tobacco. *Plant and Cell Physiology* 46: 563-578.

Cai G, Romagnoli S, Cresti M (2001) Microtubule motor proteins and the organization of the pollen tube cytoplasm. *Sexual Plant Reproduction* 14: 27-34.

Cardenas L, Lovy-Wheeler A, Wilsen KL, Hepler PK (2005) Actin polymerization promotes the reversal of streaming in the apex of pollen tubes. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 61: 112-27.

Chen CY, Wong EI, Vidali L, Estavillo A, Hepler PK, Wu HM, Cheung AY (2002) The regulation of actin organization by actin-depolymerizing factor in elongating pollen tubes. *Plant Cell* 14: 2175-2190.

Collings DA, Asada T, Allen NS, Shibaoka H (1998) Plasma membrane-associated actin in bright yellow 2 tobacco cells - Evidence for interaction with microtubules. *Plant Physiology* 118: 917-928.

Collings DA, Lill AW, Himmelspach R, Wasteneys GO (2006) Hypersensitivity to cytoskeletal antagonists demonstrates microtubule-microfilament cross-talk in the control of root elongation in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* 170: 275-290.

Del Casino C, Li Y, Moscatelli A, Scali M, Tiezzi A, Cresti M (1993) Distribution of microtubules during the growth of tobacco pollen tubes. *Bio Cell* 79: 125-132.

Del Casino C, Tiezzi A, Wagner VT, Cresti M (1992) The organization of the cytoskeleton in the generative cell and sperms of *Hyacinthus orientalis*. *Protoplasma* 168: 41-50.

Dong J, Kim ST, Lord EM (2005) Plantacyanin plays a role in reproduction in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 138: 778-789.

Foissner I, Grolig F, Obermeyer G (2002) Reversible protein phosphorylation regulates the dynamic organization of the pollen tube cytoskeleton: effects of calyculin A and okadaic acid. *Protoplasma* 220: 1-15.

Fu Y, Wu G, Yang Z (2001) Rop GTPase-dependent dynamics of tip-localized F-actin controls tip growth in pollen tubes. *Journal of Cell Biology* 152: 1019-32.

Geitmann A (1999) The rheological properties of the pollen tube cell wall. In: Cresti M, Cai G, Moscatelli A (eds) *Fertilization in higher plants: Molecular and cytological aspects*. Springer Verlag, pp 283-302.

Geitmann A (2006) Plant and fungal cytomechanics: quantifying and modeling cellular architecture. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique* 84: 581-593.

Geitmann A, Cresti M (1996) The role of the cytoskeleton and dictyosome activity in the pulsatory growth of *Nicotiana tabacum* and *Petunia hybrida* pollen tubes. *Botanica Acta* 109: 102-109.

Geitmann A, Emons AMC (2000) The cytoskeleton in plant and fungal cell tip growth. *Journal of Microscopy-Oxford* 198: 218-245.

Geitmann A, Parre E (2004) The local cytomechanical properties of growing pollen tubes correspond to the axial distribution of structural cellular elements. *Sexual Plant Reproduction* 17: 9-16.

Gibbon BC, Kovar DR, Staiger CJ (1999) Latrunculin B has different effects on pollen germination and tube growth. *Plant Cell* 11: 2349-2363.

Hasaka TP, Myers KA, Baas PW (2004) Role of actin filaments in the axonal transport of microtubules. *Journal of Neuroscience* 24: 11291-11301.

- Hepler PK, Cleary AL, Gunning BES, Wadsworth P, Wasteneys GO, Zhang DH (1993) Cytoskeletal dynamics in living plant cells. *Cell Biology International* 17: 127-142.
- Herrero M (2001) Ovary signals for directional pollen tube growth. *Sexual Plant Reproduction* 14: 3-7.
- Hiratsuka R, Yamada Y, Terasaka O (2002) Programmed cell death of *Pinus nucellus* in response to pollen tube penetration. *Journal of Plant Research* 115: 141-148.
- Hiscock SJ, Dewey FM, Coleman JOD, Dickinson HG (1994) Identification and localization of an active cutinase in the pollen of *Brassica napus* L. *Planta* 193: 377-384.
- Holdaway-Clarke TL, Hepler PK (2003) Control of pollen tube growth: role of ion gradients and fluxes. *New Phytologist* 159: 539-563.
- Holweg CL (2006) Living markers for actin block myosin-dependent motility of plant organelles and auxin. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 64: 69-81
- Hyde GJ, Davies D, Perasso L, Cole L, Ashford AE (1999) Microtubules, but not actin microfilaments, regulate vacuole motility and morphology in hyphae of *Pisolithus tinctorius*. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 42: 114-124.
- Jackson SL, Heath IB (1993) The dynamic behavior of cytoplasmic F-actin in growing hyphae. *Protoplasma* 173: 23-34.
- Jauh GY, Eckard KJ, Nothnagel EA, Lord EM (1997) Adhesion of lily pollen tubes on an artificial matrix. *Sexual Plant Reproduction* 10: 173-180.
- Jauh GY, Lord EM (1995) Movement of the tube cell in the lily style in the absence of the pollen grain and the spent pollen tube. *Sexual Plant Reproduction* 8: 168-172.

Jauh GY, Lord EM (1996) Localization of pectins and arabinogalactan-proteins in lily (*Lilium longiflorum* L) pollen tube and style, and their possible roles in pollination. *Planta* 199: 251-261.

Kaminskyj SGW, Garrill A, Brent Heath I (1992) The relation between turgor and tip growth in *Saprolegnia ferax*: Turgor is necessary, but not sufficient to explain apical extension rates. *Experimental Mycology* 16: 64-75.

Kaminskyj SGW, Heath IB (1995) Integrin and spectrin homologs, and cytoplasm-wall adhesion in tip growth. *Journal of Cell Science* 108: 849-856.

Ketelaar T, de Ruijter NCA, Emons AMC (2003) Unstable F-actin specifies the area and microtubule direction of cell expansion in Arabidopsis root hairs. *Plant Cell* 15: 285-292.

Kim S, Mollet JC, Dong J, Zhang KL, Park SY, Lord EM (2003) Chemocyanin, a small basic protein from the lily stigma, induces pollen tube chemotropism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 16125-16130.

Laitiainen E, Nieminen KM, Vihinen H, Raudaskoski M (2002) Movement of generative cell and vegetative nucleus in tobacco pollen tubes is dependent on microtubule cytoskeleton but independent of the synthesis of callose plugs. *Sexual Plant Reproduction* 15: 195-204.

Lancelle SA, Cresti M, Hepler PK (1987) Ultrastructure of the cytoskeleton in freeze-substituted pollen tubes of *Nicotiana glauca*. *Protoplasma* 140: 141-150.

Lazzaro MD (1999) Microtubule organization in germinated pollen of the conifer *Picea abies* (Norway spruce, Pinaceae). *American Journal of Botany* 86: 759-766.

Lennon KA, Roy S, Hepler PK, Lord EM (1998) The structure of the transmitting tissue of *Arabidopsis thaliana* (L.) and the path of pollen tube growth. *Sexual Plant Reproduction* 11: 49-59.

Li Y, Yen LF (2001) Plant golgi-associated vesicles contain a novel alpha-actinin-like protein. *European Journal of Cell Biology* 80: 703-710.

Li Y, Zee SY, Liu YM, Huang BQ, Yen LF (2001) Circular F-actin bundles and a G-actin gradient in pollen and pollen tubes of *Lilium davidii*. *Planta* 213: 722-730.

Lord EM (2001) Adhesion molecules in lily pollination. *Sexual Plant Reproduction* 14: 57-62.

Lord EM (2003) Adhesion and guidance in compatible pollination. *Journal of Experimental Botany* 54: 47-54.

Lovy-Wheeler A, Kunkel JG, Allwood EG, Hussey PJ, Hepler PK (2006) Oscillatory increases in alkalinity anticipate growth and may regulate actin dynamics in pollen tubes of lily. *Plant Cell* 18: 2182-2193.

Lovy-Wheeler A, Wilsen KL, Baskin TI, Hepler PK (2005) Enhanced fixation reveals the apical cortical fringe of actin filaments as a consistent feature of the pollen tube. *Planta* 221: 95-104.

MacDonald E, Millward L, Ravishankar JP, Money NP (2002) Biomechanical interaction between hyphae of two *Pythium* species (Oomycota) and host tissues. *Fungal Genetics and Biology* 37: 245-249.

Malho R, Camacho L, Moutinho A (2000) Signalling pathways in pollen tube growth and reorientation. *Annals of Botany* 85: 59-68.

- Malho R, Liu Q, Monteiro D, Rato C, Camacho L, Dinis A (2006) Signalling pathways in pollen germination and tube growth. *Protoplasma* 228: 21-30.
- Mathur J (2005) Local interactions shape plant cells. *Current Opinions in Cell Biology* 18: 40-46.
- Miller DD, de Ruijter NCA, Bisseling T, Emons AMC (1999) The role of actin in root hair morphogenesis: studies with lipochito-oligosaccharide as a growth stimulator and cytochalasin as an actin perturbing drug. *Plant Journal* 17: 141-154.
- Miller DD, Lancelle SA, Hepler PK (1996) Actin microfilaments do not form a dense meshwork in *Lilium longiflorum* pollen tube tips. *Protoplasma* 195: 123-132.
- Mollet JC, Park SY, Nothnagel EA, Lord EM (2000) A lily stylar pectin is necessary for pollen tube adhesion to an in vitro stylar matrix. *Plant Cell* 12: 1737-1749.
- Money NP (1997) Wishful thinking of turgor revisited: The mechanics of fungal growth. *Fungal Genetics and Biology* 21: 173-187.
- Money NP (1998) Mechanics of invasive fungal growth and the significance of turgor in plant infection. In: Kohmoto K, Yoder OC (eds) *Molecular Genetics of Host-Specific Toxins in Plant Disease*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 261-271.
- Money NP (2001) Biomechanics of invasive hyphal growth. In: Howard/Glow (ed) *The Mycota VIII Biology of the fungal cell*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp 3-16
- Money NP, Harold FM (1992) Extension growth of the water mold *Achlya*: Interplay of turgor and wall strength. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 4245-4249.

- Moscatelli A, Cai G, Cresti M (1997) Pollen and the pollen tube cytoskeleton. *Cell Biology International* 21: 883-885.
- Palanivelu R, Preuss D (2006) Distinct short-range ovule signals attract or repel *Arabidopsis thaliana* pollen tubes in vitro. *BMC plant Biology* 6:7 doi:10.1186/1471-2229-6-7
- Papp G, Bugyi B, Ujfalusi Z, Barko S, Hild G, Somogyi B, Nyitrai M (2006) Conformational changes in actin filaments induced by formin binding to the barbed end. *Biophysical Journal* 91: 2564-2572.
- Pavlov D, Muhrad A, Cooper J, Wear M, Reisler E (2006) Severing of F-actin by yeast cofilin is pH-independent. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 63: 533-542.
- Pelletier O, Pokidysheva E, Hirst LS, Bouxsein N, Li Y, Safinya CR (2003) Structure of actin cross-linked with alpha-actinin: A network of bundles. *Physical Review Letters* 91: (14), 148102-1-4 (2003).
- Pickett-Heaps JD, Klein AG (1998) Tip growth in plant cells may be amoeboid and not generated by turgor pressure. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 265: 1453-1459.
- Picton JM, Steer MW (1983) Membrane recycling and the control of secretory activity in pollen tubes. *Journal of Cell Science* 63: 303-310.
- Raudaskoski M, Åström H, Laitinen E (2001) Pollen tube cytoskeleton: Structure and function. *Journal of Plant Growth Regulation* 20: 113-130.

- Ravishankar JP, Davis CM, Davis DJ, MacDonald E, Makselan SD, Millward L, Money NP (2001) Mechanics of solid tissue invasion by the mammalian pathogen *Pythium insidiosum*. *Fungal Genetics and Biology* 34: 167-175.
- Riquelme M, Reynaga-Pena CG, Gierz G, Bartnicki-Garcia S (1998) What determines growth direction in fungal hyphae? *Fungal Genetics and Biology* 24: 101-109.
- Roustae A, Dechamp-Guillaume G, Gelie B, Savy C, Dargent R, Barrault G (2000) Ultrastructural studies of the mode of penetration by *Phoma macdonaldii* in sunflower seedlings. *Phytopathology* 90: 915-920.
- Sanders LC, Lord EM (1992) A dynamic role for the stylar matrix in pollen tube extension. *International Review of Cytology* 140: 297-318.
- Schopfer P (2006) Biomechanics of plant growth. *American Journal of Botany* 93: 1415-1425.
- Sogo A, Tobe H (2006) Mode of pollen tube growth in pistils of *Eucommia ulmoides* (Eucommiaceae, Garryales). *International Journal of Plant Sciences* 167: 933-941.
- Suen DF, Huang AHC (2007) Maize pollen coat xylanase facilitates pollen tube penetration into silk during sexual reproduction. *Journal of Biological Chemistry* 282: 625-636.
- Sun Y, Qian H, Xu XD, Han Y, Yen LF, Sun DY (2000) Integrin-like proteins in the pollen tube: Detection, localization and function. *Plant and Cell Physiology* 41: 1136-1142.
- Szymanski DB (2001) Arabidopsis trichome morphogenesis: A genetic approach to studying cytoskeletal function. *Journal of Plant Growth Regulation* 20: 131-140.
- Talbot NJ (1999) Plant biophysics - Forcible entry. *Science* 285: 1860-1861.

Taylor LP, Hepler PK (1997) Pollen germination and tube growth. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 461-491.

Theunis CH, Pierson ES, Cresti M (1992) The microtubule cytoskeleton and the rounding of isolated generative cells of *Nicotiana tabacum*. *Sexual Plant Reproduction* 5: 64-71.

Vidali L, Hepler PK (2001) Actin and pollen tube growth. *Protoplasma* 215: 64-76.

Vidali L, McKenna ST, Hepler PK (2001) Actin polymerization is essential for pollen tube growth. *Molecular Biology of the Cell* 12: 2534-2545.

Wakatsuki T, Schwab B, Thompson NC, Elson EL (2001) Effects of cytochalasin D and latrunculin B on mechanical properties of cells. *Journal of Cell Science* 114: 1025-1036.

Wang L, Liu YM, Li Y (2005) Comparison of F-actin fluorescent labeling methods in pollen tubes of *Lilium davidii*. *Plant Cell Reports* 24: 266-70.

Yoneda M, Nishizaki T, Tasaka K, Kurachi H, Miyake A, Murata Y (2000) Changes in actin network during calcium-induced exocytosis in permeabilized GH3 cells: calcium directly regulates F-actin disassembly. *Journal of Endocrinology* 166: 677-687.

Zonia L, Müller M, Munnik T (2006) Hydrodynamics and cell volume oscillations in the pollen tube apical region are integral components of the biomechanics of *Nicotiana tabacum* pollen tube growth. *Cell Biochemistry and Biophysics* 46: 209-232.

## **Chapitre 1:**

### **Pollen tube growth - Coping with mechanical obstacles involves the cytoskeleton**

Olivier Gossot, Anja Geitmann

**Publié dans Planta.** Reçu: 7 décembre 2006 Accepté: 31 janvier 2007 publié  
online: 22 février 2007

## **Abstract**

Cellular growth and movement requires both the control of direction and the physical capacity to generate forces. In animal cells, directional control and growth forces are generated by the polymerization of and traction between the elements of the cytoskeleton. Whether actual forces generated by the cytoskeleton play a role in plant cell growth is largely unknown, as the interplay between turgor and cell wall is considered to be the predominant structural feature in plant cell morphogenesis. We investigated the mechano-structural role of the cytoskeleton in the invasive growth of pollen tubes. These cells elongate rapidly by tip growth and have the ability to penetrate the stigmatic and stylar tissues in order to drill their way to the ovule. We used agents interfering with cytoskeletal functioning, latrunculin B and oryzalin, in combination with mechanical *in vitro* assays. While microtubule degradation had no significant effect on the pollen tubes' capacity to invade a mechanical obstacle, latrunculin B decreased the pollen tubes' ability to elongate in stiffened growth medium and to penetrate an obstacle. On the other hand, the ability to maintain a certain growth direction *in vitro* was affected by the degradation of microtubules but not actin filaments. To find out whether both cytoskeletal elements share functions or interact we used both drugs in combination resulting in a dramatic synergistic response. Fluorescent labeling revealed that the integrity of the microtubule cytoskeleton depends on the presence of actin filaments. In contrast, actin filaments seemed independent of the configuration of microtubules.

## **Keywords**

actin, invasive growth, microtubules, pollen tube, tip growth

## 1.1 Introduction

During fertilization in flowering plants, the sperm cells have to be transferred from the pollen grain through the stylar tissue in order to reach the ovary. This transfer is ensured by a cellular protrusion formed by the germinating pollen grain, the pollen tube. Morphogenesis of this structure requires a highly anisotropic mode of growth which results in the formation of a long, cylindrical cell that invades the stigmatic and stylar tissues (Taylor and Hepler 1997). The pollen tube therefore serves as a tunnel transport system for the sperm cells.

During the invasion of the stigmatic and stylar tissues, growing pollen tubes have to cope with numerous mechanical obstacles. Even though pollen tubes are able to soften these tissues either by inducing programmed cell death or by enzymatically digesting the cell walls (Greenberg 1996; Hiscock et al. 1994; Wang et al. 1996), these processes are unlikely to completely liquefy the growth matrix. The advancing apex of the elongating pollen tube, therefore, has to be able to exert sufficient penetration force and to withstand externally applied compressive stress while simultaneously maintaining the correct direction - towards the ovary. Up to a certain degree, the invasive growth of pollen tubes can therefore functionally be compared with the activities of growing axons and lamellipodia forming cells. The principal mechanical difference lies in the presence of the cell wall and the hydrostatic turgor characteristic for plant cells.

In general, a propulsion force is presumed to drive the cell wall expansion at the growing apex of tip growing plant cells and thus allows the elongating tube to exert a penetrating force. It is purported to be provided by an increase in the cellular volume caused by the uptake of water, which in turn is driven by a difference in the water potential between the protoplast and the apoplast. This is corroborated by the observation that all growing lily pollen tubes in which turgor has been measured showed pressure values of at least 0.1 MPa (Benkert et al. 1997). Also, mathematical models indicate that anisotropic

internal pressure is sufficient to explain elongation in tip growing cells (Bartnicki-Garcia et al. 2000; Shaw et al. 2000).

While being sufficient, a difference in the water potential may not be the only component of the motor driving tip growth, however, since continuing hyphal growth at decreasing turgor pressure suggested that fungal tip growth might be driven by actin polymerization when pressure is below the detection limit (Harold et al. 1996; Heath and Steinberg 1999; Kaminskyj et al. 1992; Money 1998; Pickett-Heaps and Klein 1998). A structural role for the cytoskeleton in tip growth is consistent with the finding that low concentrations of inhibitors of actin cytoskeletal functioning can block pollen tube growth without arresting cytoplasmic streaming. This suggests that in addition to organelle and vesicle transport, actin could have a more direct implication in the mechanics of pollen tube elongation (Chen et al. 2002; Gibbon et al. 1999; Vidali et al. 2001).

The concept of actin polymerization or traction generating a propulsive force or contributing in another mechanical way to plant or hyphal tip growth has never been proven, however. A similar lack of knowledge exists for microtubules. In pollen tubes, microtubules are known to be involved in the transport of the generative cell and the vegetative nucleus, in the maintenance of the shape of the generative cell, in vacuole movement and in organelle transport (Cai et al. 2001; Lovy-Wheeler et al. 2005; Raudaskoski et al. 2001). The only indication that microtubules might have a direct mechanical function related to the tip growth process derives from experiments on root hairs suggesting that they might be implicated in the control of the growth direction (Bibikova et al. 1999; Ketelaar et al. 2003; Van Bruaene et al. 2004). However, whether they contribute to the generation of a propulsive force in tip growth is unknown. Our goal was, therefore, to investigate the role of both cytoskeletal elements, microtubules and actin filaments, in the coping with mechanical obstacles and in the determining the growth direction. To this end we devised *in vitro* assays to assess the success of the pollen tube in invading or avoiding a mechanical obstacle in the presence of inhibitors of cytoskeletal

functioning. Our data indicated synergistic effects of inhibitors of actin and microtubule polymerization when used simultaneously. We therefore used fluorescence label to visualize the indirect effects of these inhibitors on the cytoskeletal element they are not specific for in order to analyze the interaction between the two polymer types.

## 1.2 Materials and methods

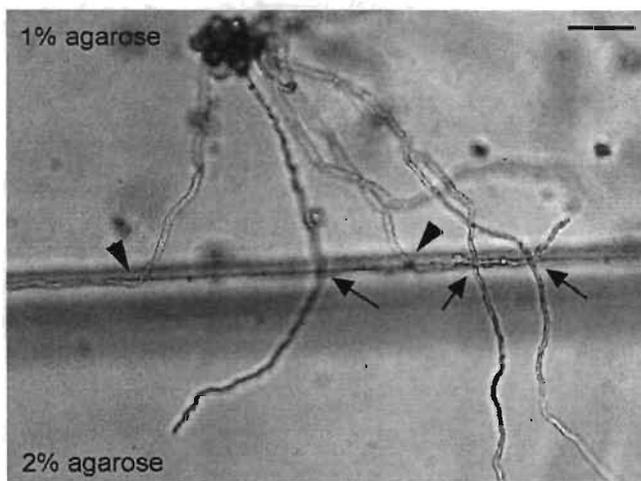
### *Pollen tube growth*

*Papaver rhoeas* pollen was obtained from plants grown in the greenhouses of the Montreal Botanical Garden. After collection, pollen was dehydrated in gelatin capsules on anhydrous calcium sulfate overnight and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Pollen was rehydrated in humid atmosphere for 30 minutes before cultivation. The growth medium contained  $100\mu\text{g.mL}^{-1}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $300\mu\text{g.mL}^{-1}$   $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot\text{H}_2\text{O}$ ,  $100\mu\text{g.mL}^{-1}$   $\text{KNO}_3$ ,  $200\mu\text{g.mL}^{-1}$   $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $50\mu\text{g.mL}^{-1}$  sucrose (modified after (Brewbaker and Kwack 1963)). For stiffening of the growth medium, agarose (type I-B, Sigma) was added in concentrations of 1, 2 or 3%w/v. 3% was the highest concentration used as pollen tube growth was reduced considerably at higher concentrations.

### *Mechanical obstacle assay*

To create an artificial mechanical obstacle for in vitro growing pollen tubes we generated an interface between two growth media stiffened by different concentrations of agarose (1% and 2%). The stiffer medium was poured into a mould to form a 1mm thick layer and following its gelation a side wall of the mould was removed to create a free, vertical edge. Subsequently, the softer medium containing the pollen grains was poured against this edge to form the interface (Fig. 8). 90 min after germination, the tubes reaching the interface were counted and the percentage of tubes that were able to penetrate into the

stiffer medium compared to those that were deviated was determined. If a drug was present, it was added to both agarose portions.



**Figure 8.** Micrograph of pollen tubes grown in the *in vitro* obstacle assay. Two adjacent portions of agarose containing growth medium (1% and 2%) are spread as a 1 mm thick layer on a microscope slide. Pollen grains are included in the 1% agarose containing growth medium. 90 min after germination, the tubes that have reached the interface between the two media are counted. The ratio between tubes that have crossed the interface (arrows) and all tubes that either crossed or touched the interface while being deviated (arrowheads) is calculated and reflects the ability of pollen tubes to invade the obstacle. Bar = 100  $\mu$ m.

#### *Fluorescent labeling for actin filaments*

Pollen was incubated in liquid medium for 1 hour. Pollen tubes were labeled following a protocol modified after Lovy-Wheeler et al. (2005). After pre-fixation with MBS-ester (M-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysulphosuccinimide ester), tubes were fixed with Pipes buffer (100mM Pipes, 5mM MgSO<sub>4</sub>, 0.5mM CaCl<sub>2</sub>, pH 9) containing 3% formaldehyde, 0.05% glutaraldehyde and 0.05% triton X-100 for 45 minutes. Tubes were washed 4 times in Pipes buffer and incubated for 2 hours with rhodamine-phalloidin (Molecular Probes) diluted 1/30 in Pipes buffer containing 10mM EGTA at pH 7. After 4 washes, pollen tubes were mounted on slides with citifluor (90% glycerol, PBS solution).

### *Fluorescent labeling for tubulin*

After a 45 min fixation with 4% formaldehyde in PM buffer (50mM Pipes, 1mM EGTA, 1mM MgCl<sub>2</sub>, pH 6.9), pollen tubes were washed 2 times and treated for 5 to 10 min with 2% w/v cellulysin® (Calbiochem) to partially digest the cell wall. After 2 washes, pollen tubes were treated with ice-cold methanol at -20°C for 5 minutes and rinsed 2 times in TBS buffer (50mM Tris, 150mM NaCl, pH 7.5) + 2%w/v BSA. Pollen was incubated overnight with a primary antibody (anti- $\alpha$ -tubulin (bovine), mouse IgG1, monoclonal 236-10501; Molecular Probes) diluted 1/200 in TBS + 2%w/v BSA and rinsed 3 times in the same buffer. After incubation for 1 to 2 hours with the secondary antibody (Alexa Fluor® 594, goat anti-mouse IgG (H+L); Molecular Probes) diluted 1/100 in TBS buffer + 2%w/v BSA and 2 washes, pollen tubes were mounted in citifluor (90% glycerol, PBS solution).

### *Microscopy*

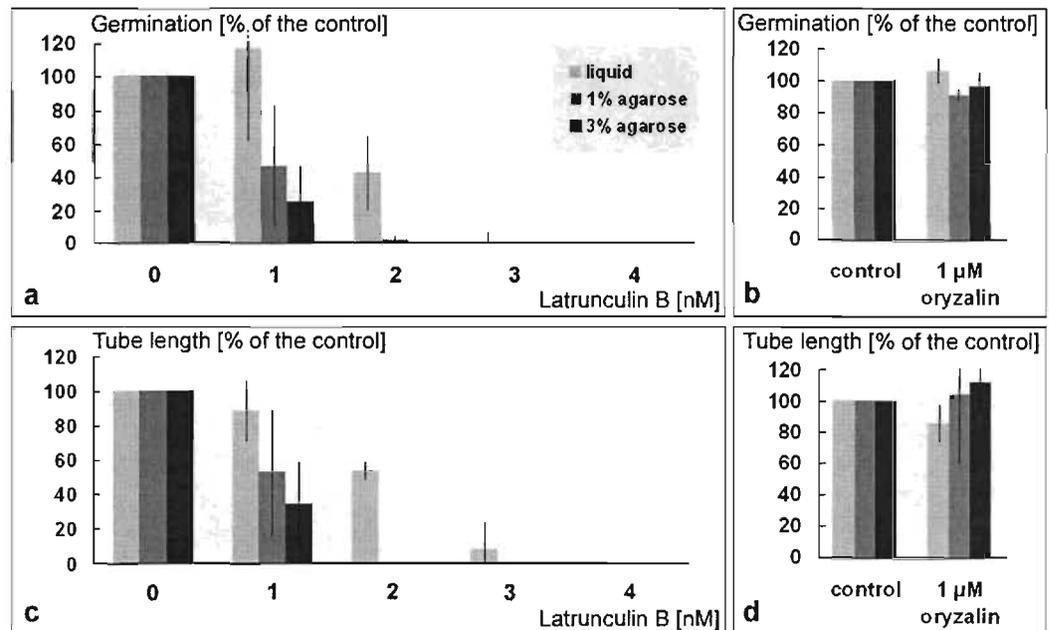
Specimens labeled for microtubules were observed in a fluorescence microscope (Nikon TE2000) equipped with a Roper fx cooled CCD camera. Pictures were acquired with ImagePro (Media Cybernetics, Carlsbad, Calif.). Specimens labeled for actin filaments were observed either with the Nikon TE2000, or a Zeiss Axio Imager.Z1 equipped with a Zeiss AxioCam MRm Rev.2 camera (pictures were acquired with the AxioVision Release 4.4 software). Confocal images were taken with a Leica TCS SP2 confocal microscope. The same microscope was used for all samples of an individual experiment. All images of fluorescence label are projections of z-stacks.

### 1.3 Results

#### *Actin depolymerization reduces the pollen tube's capacity to germinate and grow in stiffened medium*

To assess the role of actin in the generation of an invasive force, pollen was germinated either in liquid or in agarose containing growth media. Depending on the concentration, the agarose provided a range of stiffness that the growing cells would have to invade in order to elongate. To degrade actin filaments, latrunculin B (latB) was used at different concentrations in combination with these growth media. We measured germination rate and pollen tube length 90 min after germination and plotted the results of latB containing samples as fractions of the values obtained without the drug (Figs. 9 a,c).

Both germination and pollen tube length decreased dramatically between 1 and 3 nM latB. Remarkably, the sensitivity graph was very steep and the variability (standard error) of the values obtained at 1 nM latB was rather big confirming that this concentration was very critical. Comparison between the three curves representing three degrees of stiffness clearly demonstrates that both germination and pollen tube growth were more sensitive to latB when pollen grains were germinating in stiffened growth medium.

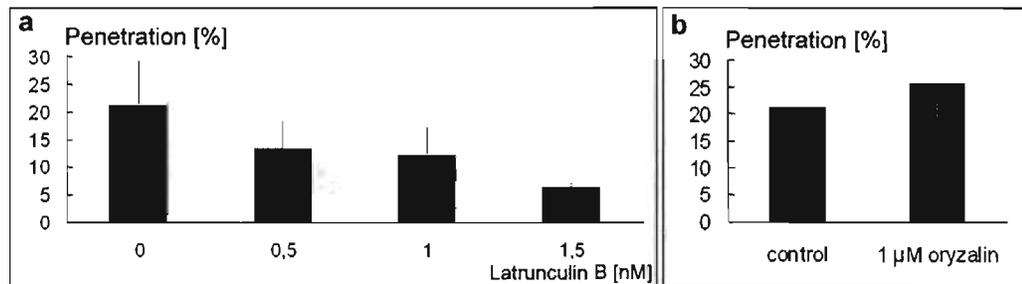


**Figure 9.** Effect of drugs interfering with cytoskeletal functioning on pollen germination and tube growth in liquid medium and media stiffened with 1% and 3% agarose. **a,b.** Germination rate of pollen incubated in the presence of latB (a) or oryzalin (b). **c,d.** Tube length after 90 min incubation in the presence of latB (c) or oryzalin (d). Results were normalized to the respective agarose control without the drug. Data are average values from 8 repetitions of the experiment.

*Actin depolymerization changes the ratio of pollen tubes invading a mechanical obstacle*

In order to discriminate between the effect of latB on pollen tube penetration and that on germination and growth, we used an in vitro mechanical obstacle assay that presents germinated pollen tubes with an interface towards a stiffer growth medium. We chose 2% agarose as the stiffer medium, since at 3% the number of tubes crossing the interface from the 1% to the 3% portion of the agarose was close to zero (not shown). This assay was used in combination with latB at concentrations up to 1.5 nM - the highest concentration still permitting significant pollen germination. Only tubes that were able to reach the interface were counted, in order to eliminate the effect that latB induced reduction on the elongation rate would have on the penetration ratio. Thus, the in vitro obstacle assay allowed us to

selectively assess the effect of moderate actin disruption on the behavior of pollen tubes upon encountering a stiffer obstacle. The penetration rate was significantly reduced by latB (Fig. 10 a). The use of 0.5 and 1 nM decreased the penetration rate to about 60% of that of untreated tubes while 1.5 nM reduced the penetration rate to approximately 30%.



**Figure 10.** Penetration rate of pollen tubes in the *in vitro* penetration assay. a. Penetration rates of pollen tubes grown for 90 min in the presence of low concentrations of latB. b. Penetration rates of pollen tubes grown for 90 min in the presence of microtubule disrupting concentrations of oryzalin.

#### *Microtubules do not seem to be involved in the capacity to invade an obstacle*

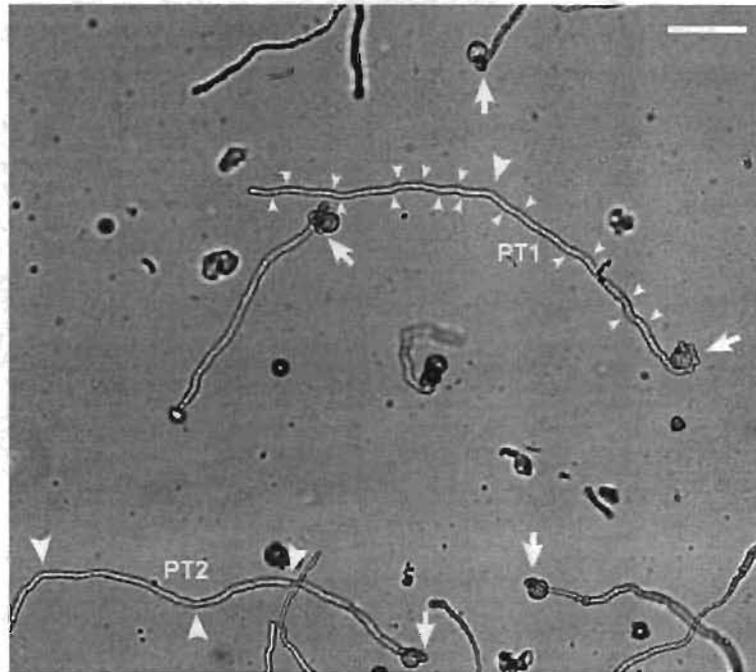
To examine the role of microtubules in the behavior of the pollen tube to invade or avoid an obstacle we assessed germination rate and tube length in liquid and stiffened media at 90 min after germination in the presence and absence of oryzalin. Oryzalin is known to degrade microtubules (Justus et al. 2004). It is also known that at concentrations that cause complete degradation of microtubules, pollen tube growth in liquid medium is not affected (Laitiainen et al. 2002). Therefore, only one concentration of oryzalin was tested here. To limit possible unspecific side effects, 1  $\mu$ M, a rather low concentration, was chosen, which nevertheless resulted in complete degradation of microtubule arrays in *Papaver* pollen tubes as evidenced by immunofluorescence label for tubulin (Fig. 15 e).

In our assay, oryzalin had no significant effect, neither on germination rate, nor on pollen tube length at 90 min, neither in liquid nor in agarose-stiffened medium (Figs. 9 b,d).

To confirm these results on pre-germinated tubes, we used oryzalin in combination with the obstacle assay. The penetration rate at the interface to the stiffer medium was not reduced in the presence of 1  $\mu$ M oryzalin. On the contrary, the data indicate a slight tendency for an increase of the penetration rate (Fig. 10 b).

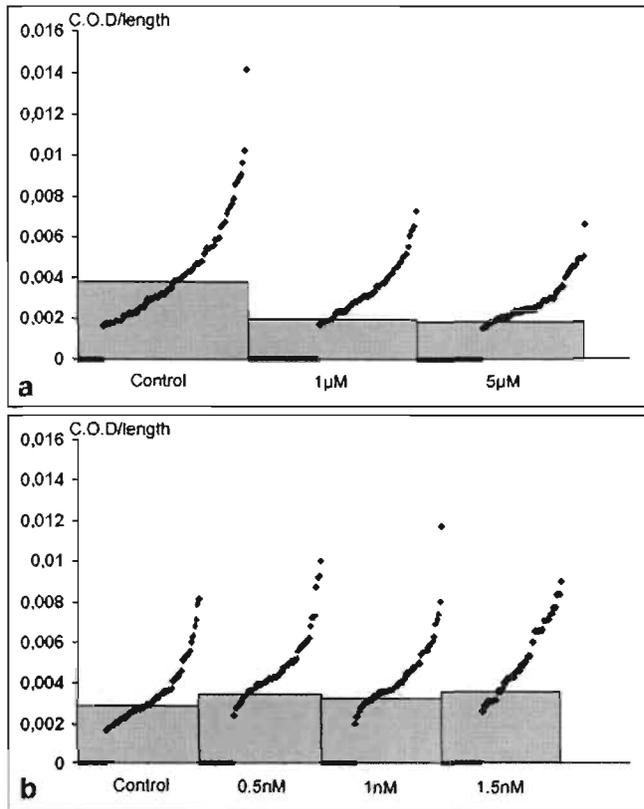
#### *Implication of the cytoskeleton in the determination of the growth direction*

A change in the ability to penetrate a stiffer substrate may be based on the ability to exert an invasive force or on the capacity to maintain or change the direction of growth to avoid the obstacle. We therefore wanted to investigate the implication of microtubules and actin filaments in determining growth direction. To do so we quantified the number of changes in growth direction of pollen tubes growing in 1% agarose in the presence or absence of oryzalin and latB. Oryzalin was used at concentrations that cause a complete disintegration of the microtubule arrays (1 $\mu$ M; 5 $\mu$ M) and latB at concentrations that affect but do not inhibit growth (0,5nM to 1,5nM). We distinguished between lasting and small/temporary changes. The former were defined as turns that caused a deviation of at least 20° from the original growth direction and that maintained the new growth direction for at least 50  $\mu$ m. In temporary or small changes the angle was below 20° or the new growth direction was maintained for less than 50  $\mu$ m (Fig 11). This included turns resulting in wavy growth. Changes were counted only starting 50  $\mu$ m from the grain as these first 50  $\mu$ m always showed a turn to orient the tube upon emerging from the grain (Fig. 11). The number of turns was divided by the length of the individual tube and all data points as well as the mean values were plotted to visualize the differences.

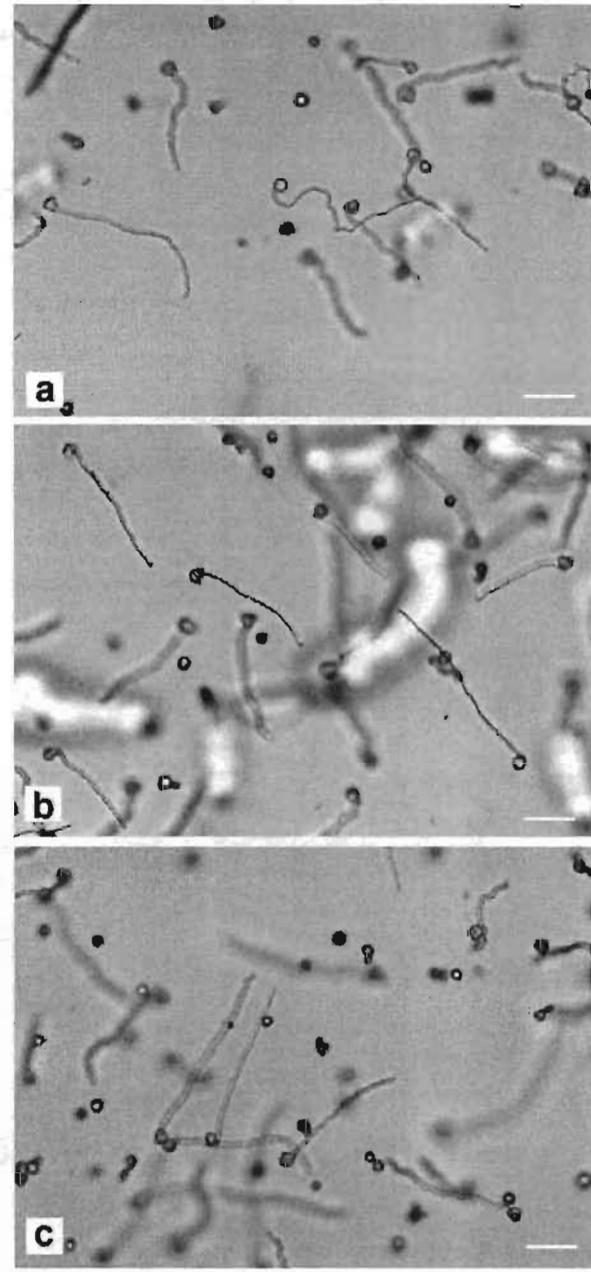


**Figure 11.** Micrograph of pollen tubes grown in 1% agarose. The arrowheads indicate changes of growth direction. Big arrowheads (marked for two pollen tubes - PT1, PT2) are lasting changes that were above  $20^\circ$  and after which the tube maintained the new direction for at least  $50\ \mu\text{m}$ . Small arrowheads (marked for PT1 only) indicate small changes of direction that had either a smaller angle or were not lasting. Arrows indicate the turning behavior of the tube on the first  $50\ \mu\text{m}$  after emergence from the grain. Bar =  $100\ \mu\text{m}$ .

The number of small/temporary changes of direction was not influenced by any of the drug treatments (not shown). However, oryzalin caused a considerable reduction in the average number of lasting changes of direction per pollen tube length ( $n=276$  pollen tubes) and a significant increase in the number of tubes that did not show any lasting turns at all (Figs. 12 a, 13). In contrast, partial destabilization of actin filaments with latB did not result in any apparent change in the average number of lasting turns per tube length or in the number of tubes that did not turn at all ( $n=352$ ) (Fig. 12 b).



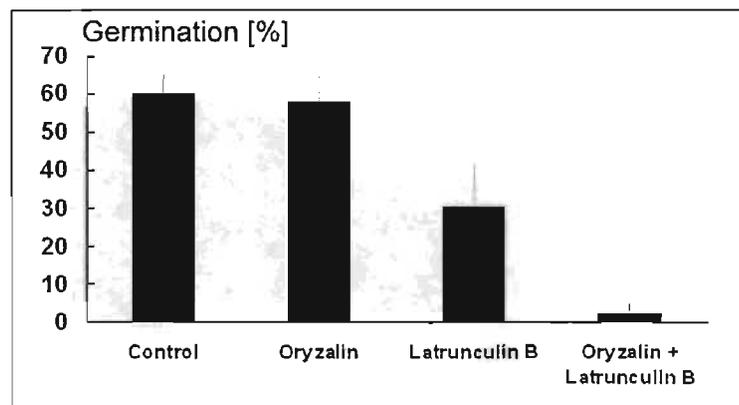
**Figure 12.** Lasting changes of direction (C.O.D) divided by the tube length for pollen tubes grown in 1% agarose growth medium. Each data point corresponds to a pollen tube. The histogram represents the average value. **a.** Pollen tubes grown in the presence of oryzalin at concentrations that completely depolymerize microtubules. **b.** Pollen tubes grown in the presence of moderate concentrations of latB. Data points are spread out horizontally in increasing order in order to allow assessing the number of tubes without turns (data points located at  $y=0$ ).  $n = 92$  tubes for each sample in the oryzalin assay and  $n = 88$  for each sample in the latB assay.



**Figure 13.** Effect of oryzalin on turning behavior as observed in the brightfield microscope. **a.** Control; **b.** 1  $\mu$ M oryzalin; **c.** 5  $\mu$ M oryzalin. Bar = 100  $\mu$ m.

### *Combined effect of latrunculin B and oryzalin*

Actin filaments and microtubules are known to interact and to partially share functions. Therefore, we assessed the effect of a combination of latB and oryzalin on pollen germination and growth. We used oryzalin at the previously tested concentration that completely disintegrates microtubule arrays but does not affect growth rate or penetration when administered as the only drug -  $1\mu\text{M}$ . For latB we chose the highest concentration that still allowed for significant albeit reduced germination -  $1.5\text{nM}$ . Surprisingly, when administered simultaneously, the effect was striking, as germination was inhibited almost completely (Fig. 14). Unfortunately, the consequence of the dramatic effect of the combined drug administration was that we were not able to perform the obstacle assay under these conditions, since the formation of pollen tubes in a significant number of cells is a necessary prerequisite for this test.



**Figure 14.** Effect of oryzalin ( $1\mu\text{M}$ ), latB ( $1.5\text{ nM}$ ) and a combination of both oryzalin and latB (same concentrations as those in individual applications) on pollen germination in 1% agarose.

### *Interaction between actin filaments and microtubules*

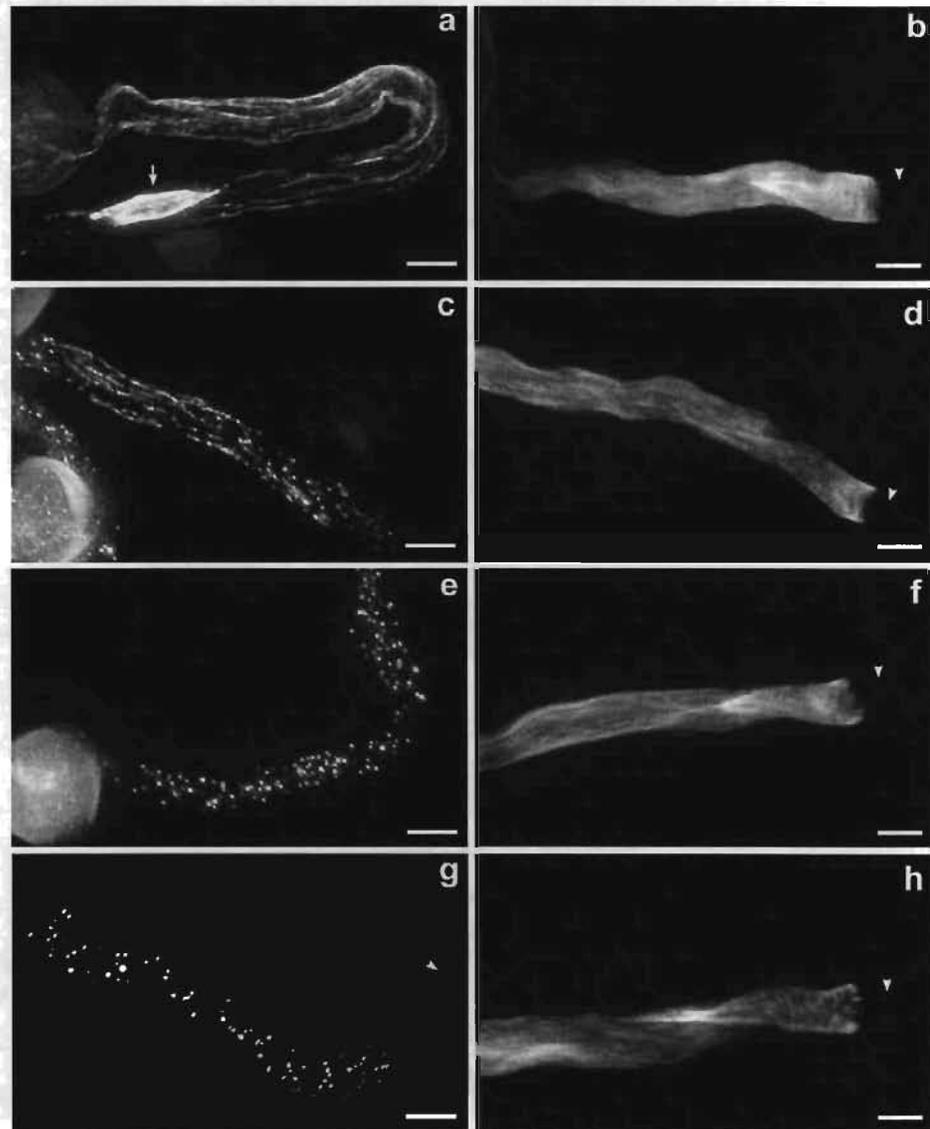
Because of the dramatic effect of the combination of oryzalin and latB, we wanted to find out whether one of the structures is dependent on the other. To this end we used fluorescent labeling to visualize actin filaments and microtubules in tubes treated with the inhibitors. We wanted to assess whether the depolymerization of one cytoskeletal structure affected the configuration of the other.

Control pollen tubes showed an actin configuration typical for growing pollen tubes as it has been described by others. It consists of long actin bundles with axial orientation in the pollen tube shank, a cortical actin fringe in the subapical region and no conspicuous actin or only short individual filaments at the extreme tip. Our samples also showed a characteristic cone shaped arrangement of actin distal of the cortical fringe. Actin filaments that were cortical in the subapex seemed to fuse into a central bundle around 20 to 30  $\mu\text{m}$  from the tip. This effect was caused by the crosslinker MBS-ester that was used as a stabilizing agent before aldehyde fixation. While being an artefact, it is interesting to note that the cortical fringe was not visibly affected by the bundling thus providing support for the previously suggested idea (Lovy-Wheeler et al. 2005) that in this subapical region actin is connected to the membrane.

Microtubules in control pollen tubes were long and axially orientated in the distal part of the tube between the grain and the generative cell. Apical of the male germ unit they appeared to be shorter, less organized, and less dense. They were absent from the very tip.

Even though oryzalin did not inhibit germination at concentrations up to 50  $\mu\text{M}$ , the drug caused partial degradation of microtubules at concentrations as low as 0.1  $\mu\text{M}$  and complete degradation at 1  $\mu\text{M}$  when present from the beginning of the germination (Fig. 15). To assess the effect of the degradation of the microtubule cytoskeleton on actin filament organization, we used rhodamine phalloidin label on tubes grown in the presence

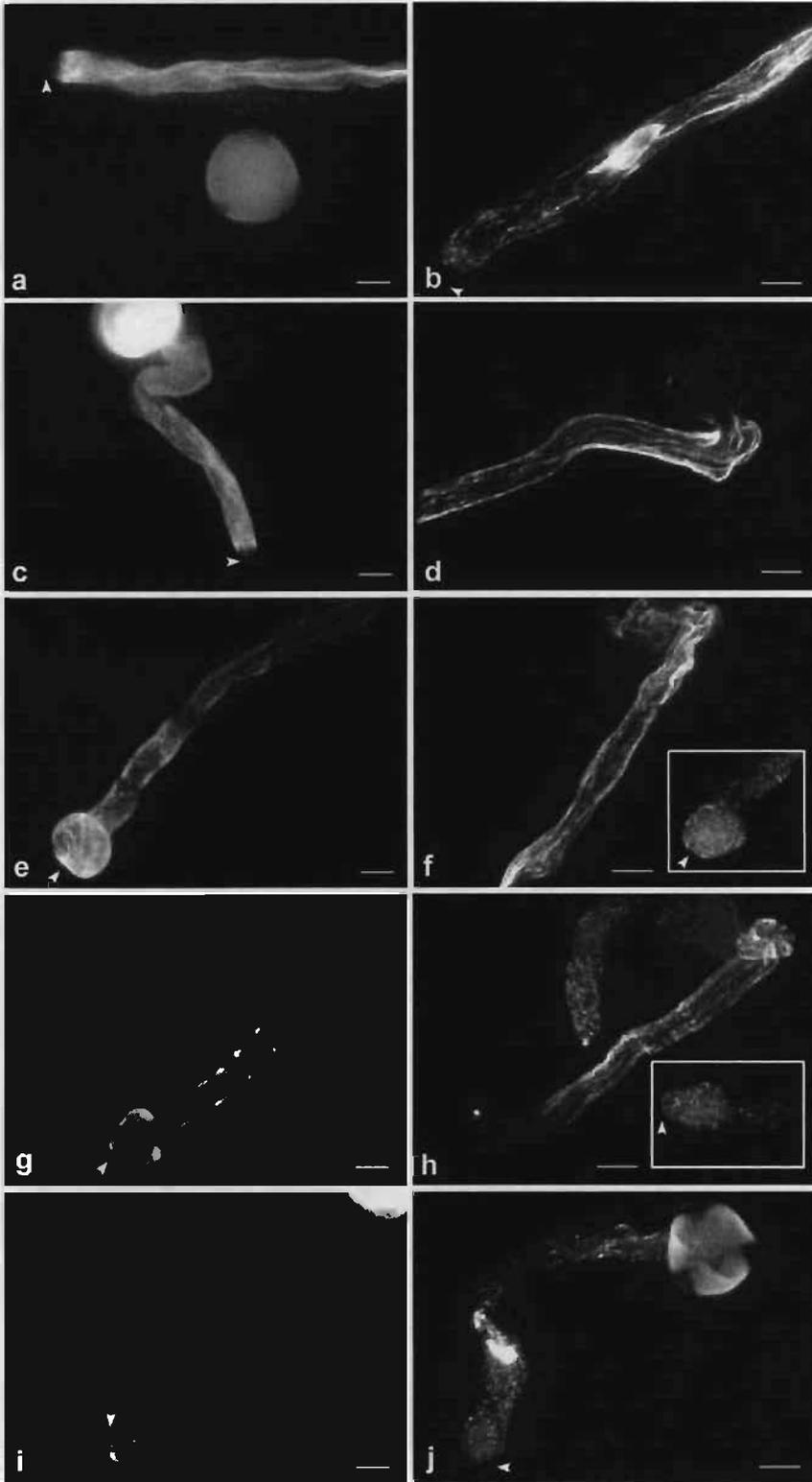
of oryzalin at 1, 2 and 30 $\mu$ M. No changes in actin organization were observed at any of the concentrations tested (Fig. 15).



**Figure 15.** Immunofluorescence label of microtubules (a,c,e,g) and rhodamine phalloidin label of actin filaments (b,d,f,h) of pollen tubes grown in the presence of oryzalin (0.1 $\mu$ M (c), 1 $\mu$ M (d,e), 2 $\mu$ M (f), 10 $\mu$ M (g) 30 $\mu$ M (h)). a and b are controls without the drug. All images are projections of z-stacks. Arrowheads indicate the tip of the pollen tube apex, the arrow indicates the generative cell. Bar = 8 $\mu$ M.

Because of the inhibitory effect of latB on pollen tube growth, the drug was added only after an initial germination period of 50 min. Processing of the cells for fluorescence label was done after a 30 min incubation with the drug. Despite the fact that a moderate concentration (3nM) of latB had an inhibitory effect on pollen tube growth, no changes in the actin organization were visible in the fluorescence microscope (Fig. 16 c). In contrast, 5nM and 10nM led to swollen tips filled densely with actin filaments and a loss of the predominantly axial orientation of the filaments in regions close to the apex (Fig. 16 e,g). In the distal regions actin filaments always maintained axial orientation (Fig. 16 g). Higher concentrations (100nM) resulted in a dramatic degradation of actin filaments into very short fragments in the entire pollen tube (Fig. 16 i).

The organization of microtubules in the distal region was not affected at 3, 5 and 10nM latB as they maintained their axial orientation (Figs. 16 d,f,h). The swollen apex was densely filled with intense speckled label, contrary to the control apex that was devoid of microtubule label (insets in Figs. 16 f,h) At 100 nM latB microtubules were degraded and only fluorescent speckles were visible in all parts of the pollen tube (Fig. 16 j).



**Fig 16.** Rhodamine phalloidin label of actin filaments (**a,c,e,g,i**) and immunofluorescence label of microtubules (**b,d,f,h,j**) in pollen tubes after 30 min of treatment with latB. **a,b.** controls; **c,d.** 3nM latB; **e,f.** 5nM latB; **g,h.** 10nM latB; **i,j.** 100nM latB. **Insets:** Swollen tips of pollen tubes treated with 5nM and 10nM latB are filled with speckled microtubule label. All images are projections. Arrowheads indicate the tip of the pollen tube apex. Bar = 8 $\mu$ M.

## 1.4 Discussion

*Actin filaments but not microtubules influence the pollen tube's behavior upon encountering a mechanical obstacle*

A pivotal function of tip growing cells is their ability to find their way through a complex growth matrix to reach their destination. This may include both avoiding obstacles and invading stiffened matrices. The force necessary to carry out this invasive activity is widely presumed to be provided by the difference in water potential between the protoplast and the apoplast. However, the cytoskeleton is prominent in these cells, and while it is unlikely that it contributes significant propulsive force as is the case in the growth cones or leading edges of migrating mammalian cells, it might play a direct or indirect mechanical role in the penetration process and (or) in the avoidance behavior.

Our first aim was, therefore, to study the role of the pollen tube cytoskeleton in the pollen tube's behavior upon encountering a mechanical obstacle. To do so, we assessed the effect of drugs interfering with the functioning of actin filaments and microtubules on pollen tubes growing in stiffened artificial media.

Our experiments revealed that pollen tube germination and growth were more sensible to the actin specific drug latB when tubes grew within a solidified medium compared to growth in liquid solution. LatB is known to cause degradation of actin filaments by preventing their polymerization. Hence these results suggest that actin filaments could be implicated in providing the pollen tubes with the force necessary to grow in solidified substrates such as agarose. We cannot exclude, however, other effects that the presence of agarose might have on pollen tube growth due to a change in the availability of water, the presence of negative surface charges and the contamination by other molecules present in the agarose.

The data were confirmed, however, by the results of the *in vitro* obstacle assay that presents a mechanical obstacle in the path of an already elongated pollen tube and thus allowed to discriminate between the effect of the drug on germination and that on pollen tube penetration. The use of moderate concentrations of latB significantly altered pollen tube behavior at the interface as fewer tubes entered the stiffer medium and more tubes turned.

Contrary to actin, microtubule depolymerization did not affect the ability of pollen tubes to grow in semi-solidified media nor their capacity to cross the interface towards a stiffer medium. There actually was a tendency for tubes to increase penetration ratio upon disintegration of microtubules. These results suggest that microtubules by themselves may not influence pollen tube behavior at mechanical obstacles.

The question arises how actin filaments could possibly influence the pollen tube's behavior to cope with a mechanical obstacle. Several explanations can be conceived.

(i) Actin polymerization or actin based traction forces might help the tube to generate a force pushing in the direction of growth. This alternative seems somewhat unlikely, since a rough estimate of the combined polymerization forces generated by the actin filaments present in the area close to the apex in fungal hyphae is at least an order of magnitude lower than the force exerted by the turgor pressure (Money 1997). Judging from published fluorescence images the amount of filamentous actin in direct contact with the pollen tube apex is even lower than that in fungal hyphae (Geitmann and Emons 2000). Therefore, this hypothesis is an unlikely explanation.

(ii) Actin might stabilize the relatively soft subapical cell wall by forming longitudinal compression struts. The apical and subapical regions of the cell wall are softer and more plastic than the cell wall in the distal regions of the cell (Geitmann and Parre 2004; Parre and Geitmann 2005a; Parre and Geitmann 2005b). Rapid freeze fixation has revealed that actin is present in this region in form of a fringe formed by short cortical

filaments in axial orientation (Lovy-Wheeler et al. 2005). It is conceivable that these filaments stabilize the cell wall and thus prevent the growing cell from easily changing growth direction. The destabilization of these filaments by latB, albeit perhaps not visible in the fluorescence microscope due to resolution limitations, could facilitate a redirection of the growth activity to avoid the obstacle thus resulting in a lowered penetration ratio.

If latB indeed had this effect of reducing the "determination" of the pollen tube to grow in a particular direction, we would have expected an increase of arbitrary turns in pollen tubes that were not exposed to any mechanical obstacles (other than the homogeneous agarose matrix) or chemical gradients that might orient growth. The quantification of these turns revealed that moderate concentrations of latB did not have any effect, however. This suggests that turns are not facilitated upon moderate interference with actin functioning.

(iii) The role of actin may not lie in the growth response, but in the perception of the obstacle. The failure to penetrate a stiffer matrix might therefore be interpreted as a capacity to avoid an obstacle which would require the ability of the pollen tube to perceive the presence of this obstacle. The actin cytoskeleton has been found to modulate calcium channel opening in animal cells (Schubert and Akopian 2004) and therefore, latrunculin B could influence signal perception and (or) growth behavior indirectly by altering calcium fluxes. However, it is doubtful whether a 3% agarose obstacle would cause a signal that is quantitatively very different from that of a 2% agarose obstacle. To be consistent with our data, this would have to be the case, however, as invasion of a 3% agarose obstacle but not that of 2% agarose was virtually impossible for tubes originating in 1% agarose.

Alternative explanations for the mechanical role of actin in the pollen tube's behavior at a mechanical obstacle need therefore to be found. It is interesting to note that low doses of cytochalasin D inhibit growth pulsations in pollen tubes of *Nicotiana tabacum* and *Petunia hybrida* (Geitmann and Cresti 1996). These pulsations had been hypothesized to facilitate invasive growth (Geitmann 1999) according to the principle of the hydraulic

hammer. However, poppy pollen tubes, while showing oscillations in the growth rate do not show the extreme pulsations observed in the pollen tube species mentioned above. Whether or not the two phenomena are nevertheless related warrants further investigation.

*Microtubules may be implicated in changing the growth direction*

Contrary to actin filaments, microtubules seem to be implicated in the capacity of a tube to change growth direction as oryzalin treated pollen tubes were much straighter than the control cells. This is consistent with the slightly higher success rate of oryzalin treated pollen tubes in penetrating a mechanical obstacle. It seems as if the presence of a functional microtubule cytoskeleton allows the pollen tubes to turn and avoid the obstacle, whereas straight growth and thus invasion of the obstacle is favored without microtubule arrays. While the finding that microtubules are involved in the directionality of tip growth in pollen tubes is consistent with observations made in root hairs, the mechanism might differ between the cell types. Contrary to the drug induced straightening of pollen tubes, pharmacological interference with microtubule polymerization in root hairs causes erratic growth (Bibikova et al. 1999). Invasive growth was not assessed by these authors. However, these seemingly contradictory data have to be seen in the light of the differing functions and growth strategies of these two cell types. The optimal growth pattern in root hairs is straight, perpendicular to the root axis, in order to reach those areas that are as far away from the root as possible. The ability to turn is thus not anything that should be favored in the absence of mechanical obstacles. Pollen tubes on the other hand need to find their aim (the embryo sac) in a very complex environment (the stigma, style and ovary). Straight growth is not necessarily an advantageous strategy in this case, the ability to turn upon encountering chemical and physical cues is essential. These two different ways of life might therefore explain the differences in cytoskeletal control of directionality of the tip growth process.

### *Actin filaments and microtubules interact*

Since microtubules and actin filaments are known to interact and (or) to share certain functions, we administered the two inhibitory drugs simultaneously. The finding that this treatment resulted in an almost complete inhibition of germination - a much stronger reaction than the sum of the responses to the individual drugs - indicates a synergistic effect of the inhibitors. A possible interpretation is that one cytoskeletal element stabilizes or serves as a scaffold for the other.

To verify this and to identify the stabilized and the stabilizer, we visualized the configurations of actin and microtubules in latB and oryzalin treated pollen tubes. We examined the effect of each drug on the organization of its target and on the organization of the other cytoskeletal component. Oryzalin caused complete degradation of microtubules at concentrations as low as 1  $\mu\text{M}$ . However, despite this dramatic effect on microtubules, oryzalin had no visible effect on actin filament organization, even at high concentration (30 $\mu\text{M}$ ). Cells treated with up to 30 $\mu\text{M}$  oryzalin had the same apical actin organization as the control samples - i.e. a cortical fringe located close to the dome shaped apex followed by long arrays of actin arranged approximately parallel to the longitudinal axis. Thus, depolymerization of microtubules had no effect on the configuration of actin filaments. This strongly suggests that organization and polymerization of actin filaments does not depend on microtubules in *Papaver rhoeas* pollen tubes. These results differ from those reported by Laitinen et al. (2002) who observed that oryzalin treatments reorganized actin organization in the *Nicotiana tabacum* pollen tube tip. These differences may result from differences between plant species, but more likely they are caused by the difference in age of the pollen tubes. We observed the cells after only 1 hour of in vitro growth, whereas the *N. tabacum* pollen tubes were observed at 4 or 12 hours after germination in vitro - a very extended time at which pollen tubes grown in vitro and in the presence of a drug might suffer numerous secondary effects.

In a reciprocal experimental setup, actin filaments and microtubules were labeled after exposure to latB. As expected, moderate concentrations of the drug caused actin arrays to change their strictly axial orientation in regions close to the tip, whereas high concentrations led to complete degradation of actin filaments. No apical swelling was seen at 100nM latB probably because of the sudden effect of latB at this concentration. Even though latB is not known to affect microtubules directly, 100nM latB resulted in a complete degradation of microtubules and appearance of speckled microtubule label concomitant to the disintegration of actin filaments. This is unlikely to be a secondary effect resulting from the growth arrest, since lower concentrations of latB do not cause microtubule depolymerization albeit inhibiting pollen tube growth. Therefore, one can conclude, that the presence of actin arrays is needed for microtubule stability or polymerization.

The synergistic effect of the two drugs therefore seems to lie in the stabilization or guidance of the polymerization of microtubules by actin filaments. It is therefore puzzling to note that microtubule depolymerization has an exacerbating effect on latB induced inhibition of germination, as this suggests the inverse relationship - a stabilization of actin by microtubules. This latter model would be consistent with the role of a microtubule scaffold serving to impose direction for actin polymerization as it has been proposed for root hairs (Ketelaar et al. 2003). The interaction between actin and microtubules has been an important focal point of recent investigations mostly in the animal field (Rodriguez et al. 2003), but advances are also made in plant related research (Collings et al. 2006). A better understanding of the structural and functional interactions will be pivotal for the characterization and interpretation of the seemingly contradictory observations reported here.

## 1.5 Conclusions

Using mechanical assays, we showed that the actin cytoskeleton influences the pollen tube's behavior upon encountering a mechanical obstacle, while microtubules seem to have no significant implication in this situation. Interestingly, microtubules do seem to play a role in the pollen tube's capacity to change growth direction in the absence of mechanical obstacles.

It remains to be analyzed whether the contribution of actin in invasive tip growth is direct, i.e. in form of the generation of a propulsion force based on actin polymerization or traction. Alternatively, the involvement of actin might be based on an indirect mechanical function such as the control of cell expansion by way of regulating secretion events, by controlling calcium channel opening or by confining the spatial distribution of cell wall properties (Ketelaar et al. 2003).

It is clear from our drug combination experiments that in order to fully understand the role of the cytoskeleton in growth processes of plant cells, the interactions between actin filaments and microtubules have to be taken in account; in particular the influence of actin filaments on microtubules cytoskeleton seems to be critical.

## 1.6 Acknowledgements

This work was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and the Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT).

## References

- Bartnicki-Garcia S, Bracker CE, Gierz G, Lopez-Franco R, Lu HS (2000) Mapping the growth of fungal hyphae: Orthogonal cell wall expansion during tip growth and the role of turgor. *Biophysical Journal* 79: 2382-2390.
- Benkert R, Obermeyer G, Bentrup FW (1997) The turgor pressure of growing lily pollen tubes. *Protoplasma* 198: 1-8.
- Bibikova TN, Blancaflor EB, Gilroy S (1999) Microtubules regulate tip growth and orientation in root hairs of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 17: 657-665.
- Brewbaker J, Kwack B (1963) The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. *American Journal of Botany* 50: 859-865.
- Cai G, Romagnoli S, Cresti M (2001) Microtubule motor proteins and the organization of the pollen tube cytoplasm. *Sexual Plant Reproduction* 14: 27-34.
- Chen CY, Wong EI, Vidali L, Estavillo A, Hepler PK, Wu HM, Cheung AY (2002) The regulation of actin organization by actin-depolymerizing factor in elongating pollen tubes. *Plant Cell* 14: 2175-90.
- Collings DA, Lill AW, Himmelspach R, Wasteneys GO (2006) Hypersensitivity to cytoskeletal antagonists demonstrates microtubule-microfilament cross-talk in the control of root elongation in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* 170: 275-290.
- Geitmann A (1999) The rheological properties of the pollen tube cell wall. In: Cresti M, Cai G, Moscatelli A eds) *Fertilization in higher plants: Molecular and cytological aspects*. Springer Verlag, pp 283-302.

Geitmann A, Cresti M (1996) The role of the cytoskeleton and dictyosome activity in the pulsatory growth of *Nicotiana tabacum* and *Petunia hybrida* pollen tubes. *Botanica Acta* 109: 102-109.

Geitmann A, Parre E (2004) The local cytomechanical properties of growing pollen tubes correspond to the axial distribution of structural cellular elements. *Sexual Plant Reproduction* 17: 9-16.

Gibbon BC, Kovar DR, Staiger CJ (1999) Latrunculin B has different effects on pollen germination and tube growth. *Plant Cell* 11: 2349-2363.

Greenberg JT (1996) Programmed cell death: A way of life for plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 12094-12097.

Harold RL, Money NP, Harold FM (1996) Growth and morphogenesis in *Saprolegnia ferax*: is turgor required? *Protoplasma* 191: 105-114.

Heath IB, Steinberg G (1999) Mechanisms of hyphal tip growth: Tube dwelling amoebae revisited. *Fungal Genetics and Biology* 28: 79-93.

Hiscock SJ, Dewey FM, Coleman JOD, Dickinson HG (1994) Identification and localization of an active cutinase in the pollen of *Brassica napus* L. *Planta* 193: 377-384.

Justus CD, Anderhag P, Goins JL, Lazzaro MD (2004) Microtubules and microfilaments coordinate to direct a fountain streaming pattern in elongating conifer pollen tube tips. *Planta* 219: 103-109.

Kaminskyj SGW, Garrill A, Brent Heath I (1992) The relation between turgor and tip growth in *Saprolegnia ferax*: Turgor is necessary, but not sufficient to explain apical extension rates. *Experimental Mycology* 16: 64-75.

Ketelaar T, de Ruijter NCA, Emons AMC (2003) Unstable F-actin specifies the area and microtubule direction of cell expansion in *Arabidopsis* root hairs. *Plant Cell* 15: 285-292.

Laitiainen E, Nieminen KM, Vihinen H, Raudaskoski M (2002) Movement of generative cell and vegetative nucleus in tobacco pollen tubes is dependent on microtubule cytoskeleton but independent of the synthesis of callose plugs. *Sexual Plant Reproduction* 15: 195-204.

Lovy-Wheeler A, Wilsen KL, Baskin TI, Hepler PK (2005) Enhanced fixation reveals the apical cortical fringe of actin filaments as a consistent feature of the pollen tube. *Planta* 221: 95-104.

Money NP (1997) Wishful thinking of turgor revisited: The mechanics of fungal growth. *Fungal Genetics and Biology* 21: 173-187.

Money NP (1998) Mechanics of invasive fungal growth and the significance of turgor in plant infection. In: Kohmoto K, Yoder OC eds) *Molecular Genetics of Host-Specific Toxins in Plant Disease*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 261-271.

Parre E, Geitmann A (2005a) More than a leak sealant. The mechanical properties of callose in pollen tubes. *Plant Physiology* 137: 274-286.

Parre E, Geitmann A (2005b) Pectin and the role of the physical properties of the cell wall in pollen tube growth of *Solanum chacoense*. *Planta* 220: 582-92.

Pickett-Heaps JD, Klein AG (1998) Tip growth in plant cells may be amoeboid and not generated by turgor pressure. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 265: 1453-1459.

- Raudaskoski M, Astrom H, Laitinen E (2001) Pollen tube cytoskeleton: Structure and function. *Journal of Plant Growth Regulation* 20: 113-130.
- Rodriguez OC, Schaefer AW, Mandato CA, Forscher P, Bement WM, Waterman-Storer CM (2003) Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis. *Nature Cell Biology* 5: 599-609.
- Schubert T, Akopian A (2004) Actin filaments regulate voltage-gated ion channels in salamander retinal ganglion cells. *Neuroscience* 125: 583-590.
- Shaw SL, Dumais J, Long SR (2000) Cell surface expansion in polarly growing root hairs of *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* 124: 959-969.
- Taylor LP, Hepler PK (1997) Pollen germination and tube growth. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 461-491.
- Van Bruaene N, Joss G, Van Oostveldt P (2004) Reorganization and in vivo dynamics of microtubules during arabidopsis root hair development. *Plant Physiology* 136: 3905-3919.
- Vidali L, McKenna ST, Hepler PK (2001) Actin polymerization is essential for pollen tube growth. *Mol Biol Cell* 12: 2534-45.
- Wang H, Wu HM, Cheung AY (1996) Pollination induces mRNA poly(A) tail-shortening and cell deterioration in flower transmitting tissue. *Plant Journal* 9: 715-727.

## **Chapitre 2**

### **Visualisation des microtubules et des filaments d'actine**

**Optimisation des protocoles de fixation et de marquage pour les  
tubes polliniques de *Papaver rhoeas***

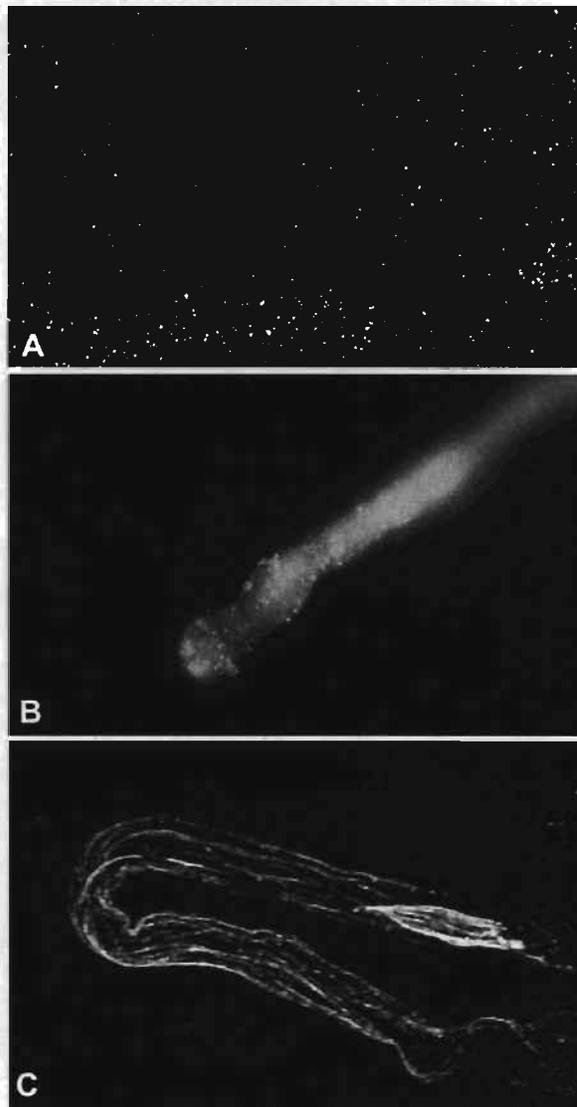
## 2.1 Introduction

Les méthodes de marquage du cytosquelette sont parties intégrantes de nombreuses expériences. Cependant, les protocoles varient avec le type de cellules et le type de résultats souhaités. Ainsi, la visualisation du cytosquelette d'une cellule à croissance rapide telle que le tube pollinique représente un défi nettement supérieur à celle du cytosquelette d'une cellule modèle animale telle que les fibroblastes. De plus, la visualisation des microtubules et des filaments d'actine à des fins d'interprétation de leur rôle structural nécessite le maintien de l'organisation réelle du cytosquelette lors des étapes de fixation et de marquage. S'il est souvent facile d'observer des filaments en utilisant des protocoles génériques, l'observation de structures intègres est un processus nécessitant de nombreuses mises au point et ce, pour chaque type cellulaire et chaque espèce utilisée.

Dans le cadre de notre étude sur le rôle du cytosquelette dans la force et la direction de croissance ainsi que dans la morphologie du tube pollinique de *Papaver rhoeas*, Il était primordial de pouvoir obtenir les meilleures images possibles du cytosquelette. Comme le protocole précédent pour le marquage des microtubules avait donné des résultats inexploitable (aucun filament visible), nous nous sommes dans un premier temps intéressés à le rendre fonctionnel. Par la suite nous avons testé de nombreuses variations du protocole de marquage déjà existant pour les filaments d'actine. Ces essais rentrent dans le cadre des discussions actuelles sur l'organisation du cytosquelette d'actine du tube pollinique, particulièrement en partie apicale. Ces différents essais de marquage de l'actine nous ont permis d'établir de nouveaux protocoles, qui diffèrent beaucoup du précédent, tant par les méthodes que par les résultats. Ces expériences nous ont aussi permis de mieux cerner les effets de chacun des composants ajoutés et ainsi de comprendre certains artéfacts liés aux méthodes de fixation.

## 2.2 Marquage des microtubules

La méthode conventionnelle de visualisation des microtubules utilise de l'immunomarquage. Suite à une fixation chimique, deux anticorps sont utilisés. Le premier est un anti- $\alpha$ -tubuline et le second est un anticorps spécifique pour les immunoglobulines de l'espèce animale dans lequel a été produit le premier anticorps. Il est couplé à un marqueur fluorescent. Les lames préparées suite à ces étapes sont observées en microscopie à fluorescence. Nous avons dans un premier temps utilisé le protocole précédemment utilisé pour le pollen d'autres espèces sur du pollen de pavot germant dans des gouttes de milieu de croissance solidifiées avec de l'agarose. Ces premiers essais ont montré une répartition de la fluorescence en tâches sur l'ensemble de la lame, ni les microtubules ni même les grains de pollen n'étaient visibles (Fig. 17.A). L'utilisation de ce même protocole en milieu liquide nous a permis d'obtenir de la fluorescence restreinte aux tubes polliniques. Elle était cependant toujours répartie sous forme de tâches dispersées (Fig. 17.B).



**Figure 17** : Essais de marquage des microtubules dans différentes conditions. A. En agarose et avec l'utilisation de pectinase et de gluconase. B. En milieu liquide, avec utilisation de pectinase et gluconase. C. En milieu liquide, avec utilisation de Cellulysin© au lieu de la pectinase et de la gluconase.

Cette première observation suggère que certains des composés du protocole de marquage (probablement les anticorps ou les enzymes de digestion) ne parviennent pas à se déplacer suffisamment rapidement en milieu solidifié avec de l'agarose (1%). Un

allongement du temps d'incubation de chacune des étapes du protocole nous aurait probablement permis de déterminer celle qui était critique et d'obtenir de meilleurs résultats en agarose, mais nous avons privilégié l'obtention de résultats et nous sommes donc concentrés sur l'utilisation de milieu liquide. La présence de fluorescence uniquement dans les tubes polliniques montre que contrairement aux essais en agarose, les deux anticorps ont réussi à pénétrer dans les tubes. Cependant la présence des tâches de fluorescence suggère que 1) l'anticorps primaire reconnaît mal la tubuline 2) l'anticorps secondaire reconnaît mal l'anticorps primaire et/ou 3) que les microtubules ont été dégradés en courts fragments au cours des différentes étapes de la fixation et du marquage. Considérant que les deux anticorps sont des « classiques » du marquage de la tubuline, l'hypothèse 3 était de loin la plus probable. Il nous a donc fallu déterminer quelles pouvaient être les étapes du protocole susceptibles de dégrader les microtubules. Parmi ces étapes, les candidates possibles étaient : 1) La fixation chimique avec 4% de formaldéhyde pendant 45 minutes. 2) la digestion de la paroi avec 1% de glucanase et 1% de pectinase pendant 10 minutes. 3) le lavage au méthanol -20°C pendant 5 minutes (pour les protocoles voir annexe 1 et 2).

Nous avons par conséquent fait varier les concentrations et les temps d'incubations de chacune de ces trois étapes afin de déterminer laquelle (ou lesquelles) étaient critiques pour l'intégrité du cytosquelette. Ces essais ont montré que les enzymes de digestion de la paroi, glucanase et pectinase (qui sont nécessaires pour permettre aux anticorps de pénétrer à l'intérieur de la cellule), causent une dégradation des microtubules. Ainsi, quand le temps de digestion de la paroi est de 5 minutes au lieu de 10, des microtubules deviennent légèrement visibles. Il est difficile de déterminer si ces enzymes agissent directement sur les microtubules ou bien si leur action sur la paroi cause la dégradation des microtubules du fait de la relation étroite qui existe entre la paroi et le cytosquelette.

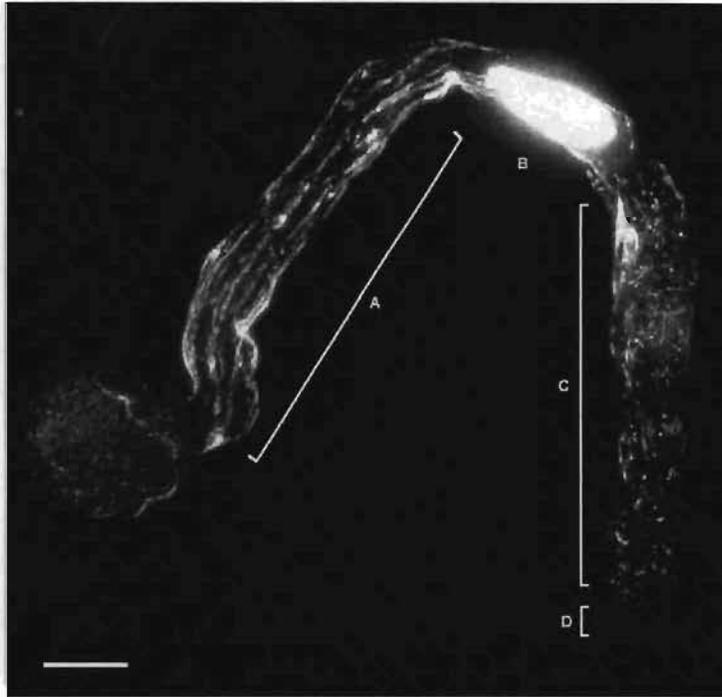
De nombreux protocoles présents dans la littérature utilisent une cellulase : la Cellulysin© pour perméabiliser la paroi. Nous avons également utilisé cette enzyme pour

remplacer les deux précédentes; ce changement nous a permis de conserver l'organisation des microtubules (Fig. 17.C).

À ces changements majeurs, nous avons également apporté certaines modifications de moindre importance, mais qui résultent en des images plus claires. Ainsi une incubation « overnight » du premier anticorps est préférable (mais une incubation de 1hr30 peut fournir des résultats, qui bien que moins lumineux sont suffisants). De même il semble important, comme pour le marquage de l'actine, d'augmenter le nombre de lavages entre les étapes; particulièrement après le deuxième anticorps, avant le montage sur lame. Un grand nombre de lavages permet de réduire le fond fluorescent, présent dans les tubes et sur l'ensemble de la lame, et qui, s'il n'est pas très critique pour l'observation à l'œil nu, nuit à la prise de photo (particulièrement lors de la création de projections issues de séries d'images Z-stack).

Nos efforts pour développer un protocole efficace de marquage des microtubules se heurtent cependant à l'instabilité de ces polymères. Comme il a été déjà observé par d'autres laboratoires étudiant les microtubules chez les tubes polliniques, le marquage est de bonne qualité en partie distale et autour de la cellule générative mais seuls de courts fragments de microtubules sont visibles dans la partie apicale du tube (Fig. 18).

Le nouveau protocole est donné en annexe 1 en anglais, car il s'agit d'un document utilisé au sein du laboratoire. Les parties générales communes aux différentes méthodes de marquage, celles concernant la préparation des solutions et celles concernant l'hydratation et la germination du pollen sont issues du protocole précédent.



**Figure 18** : Organisation des microtubules tels qu'observés avec le nouveau protocole. A. Partie distale : longs microtubules axiaux. B. Cellule générative. C. Moitié apicale du tube : microtubules courts et ayant une orientation aléatoire. D. apex : pas de microtubules. Barre= 8 $\mu$ m

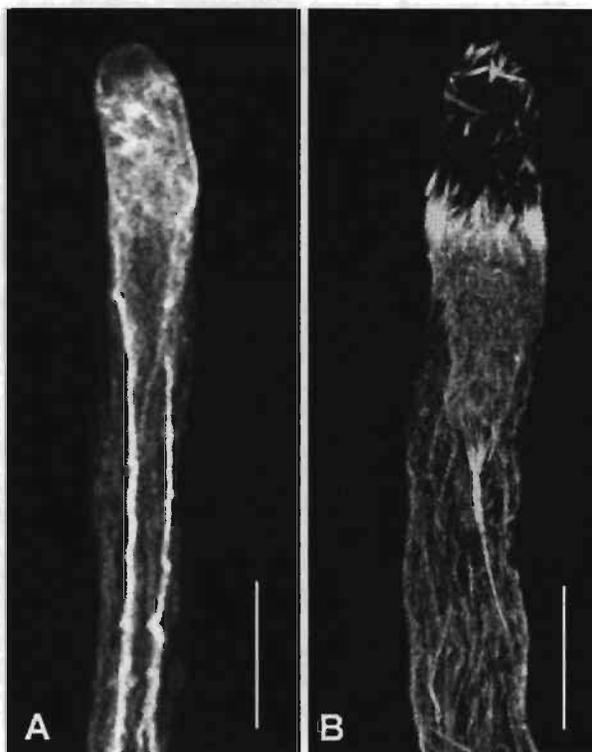
### 2.3 Marquage et organisation des filaments d'actine

La visualisation des filaments d'actine offre des résultats nettement plus probants que celle des microtubules et ce, même en partie apicale. Ceci s'explique notamment par leur rôle primordial qui a conduit une étude plus approfondie que celle des microtubules et également par une plus grande efficacité du protocole de marquage. Cependant, comme les microtubules, les filaments d'actine sont des polymères très dynamiques et très instables. Cette instabilité est encore plus grande dans les tubes polliniques du fait du mode d'expansion cellulaire localisée à l'apex et de la grande vitesse de croissance. Si

l'organisation de l'actine F en partie distale est généralement commune à l'ensemble des méthodes de fixation, celle de l'apex est elle, très variable. Ces différences s'expliquent là encore par la croissance cellulaire restreinte à l'apex et également par la grande complexité de l'organisation du cytosquelette d'actine dans cette section. Les étapes de préparation et de fixation sont donc très critiques et déterminent l'organisation observée en microscopie à fluorescence suite à toutes les étapes du marquage et au montage sur lame.

La fixation chimique basée sur l'utilisation de formaldéhyde et/ou de glutaraldéhyde est utilisée depuis de nombreuses années et est encore la méthode la plus courante. Cette fixation pouvant prendre jusqu'à 15 minutes (Geitmann and Emons 2000), il est apparu qu'elle n'était pas le meilleur moyen de visualiser le cytosquelette d'une cellule ayant une croissance aussi rapide que le tube pollinique. Des méthodes de cryofixation ont été développées et sont supérieures à la fixation chimique (Geitmann and Emons 2000), elles permettent une fixation beaucoup plus rapide de la cellule. Elles sont cependant difficiles à mettre en place. Beaucoup de nouvelles méthodes reposent sur l'utilisation d'ABPs recombinantes pour permettre la visualisation des filaments d'actine dans des cellules vivantes (Holweg 2006). Des protéines fluorescentes (généralement la GFP) y sont fusionnées à des ABPs telles que la taline, la fimbrine ou l'ADF (Chen et al. 2002; Holweg 2006; Lovy-Wheeler et al. 2006). Cette approche présente l'avantage de pouvoir observer le cytosquelette de tube pollinique en croissance et également celui d'éviter les artéfacts liés aux étapes de fixation. Cependant, elles révèlent actuellement une population restreinte de filaments et comme les ABPs ont un rôle crucial dans le fonctionnement du cytosquelette, la surexpression d'ABPs à des fins de marquage tend à créer une compétition avec les ABPs endogènes et donc, là encore, à induire des artéfacts. Il a par exemple été montré que le trafic intracellulaire est réduit dans ces lignées (Holweg 2006). Nos études nécessitaient la visualisation de l'ensemble des filaments, nous avons donc privilégié le marquage de l'actine chez des tubes polliniques fixés et nous avons cherché à optimiser les étapes de fixation afin d'obtenir les meilleurs résultats possibles.

Le précédent protocole, présent et utilisé dans le laboratoire, amène de bons résultats et sa validité n'est pas ici remis en cause (Fig. 19.A). Cependant, l'organisation des filaments d'actine étant si sensible à la manipulation et à la fixation, elle fait l'objet de nombreuses discussions, particulièrement concernant les régions apicales et sous-apicales du tube pollinique. De nouvelles méthodes de cryofixation et de fixation chimique ont ainsi suggéré que l'actine sous-apicale formerait un cylindre cortical constitué de filaments axiaux (Lovy-Wheeler et al. 2005) (Fig. 19.B) et non pas un dense réseau d'actine F désorganisée (Fig. 19.A) comme généralement décrit précédemment. Dans ce contexte nous avons souhaité faire évoluer notre protocole chez *Papaver rhoeas* en nous inspirant du protocole de fixation chimique de Lovy-Wheeler et al. (2005) pour *Lilium*. Notre objectif était, dans un premier temps, d'obtenir de tels résultats chez cette espèce mais également de nous faire une idée sur les différents artéfacts liés à la fixation et donc de pouvoir déterminer quel modèle (cylindre cortical ou réseau d'actine désorganisée) s'approche le plus de la réalité. Ces essais étaient motivés par la perspective biomécanique de notre étude. Il est probable que si les filaments d'actine ont un rôle dans la force et la direction de croissance ou dans le maintien de la forme de l'apex, alors une structure organisée telle que le cylindre cortical serait plus probable qu'une structure désorganisée qu'il est plus difficile de lier à une fonction.



**Figure 19** : Organisation de l'actine sous-apicale. A. Protocole précédemment utilisé – réseau désorganisé d'actine sous-apicale. B. Nouveau protocole – cylindre cortical d'actine sous-apicale. Bar=10 $\mu$ M.

Nous avons trouvé que le M-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysulphosuccinimide ester (MBS-ester) ajouté avant la fixation, bien qu'indispensable à la préservation des filaments d'actine, introduit de nombreux artéfacts liés à son action de « cross-linker » spécifique de l'actine. Les protocoles de marquage de l'actine présents dans la littérature utilisent généralement ce composé. Sa concentration y varie toujours entre 100 et 200  $\mu$ M. Comme reporté par Lovy-Wheeler et al. (2005), nous avons observé que de telles concentrations ont tendance à regrouper l'actine en gros faisceaux généralement ondulés (Fig. 19.A). Nous avons donc testé différentes concentrations de MBS-ester et observé que ce produit est également responsable de la perte de l'organisation du réseau d'actine sous-apicale. Nous avons également établi que chez le pavot 10  $\mu$ M pendant 10 à 20 minutes est

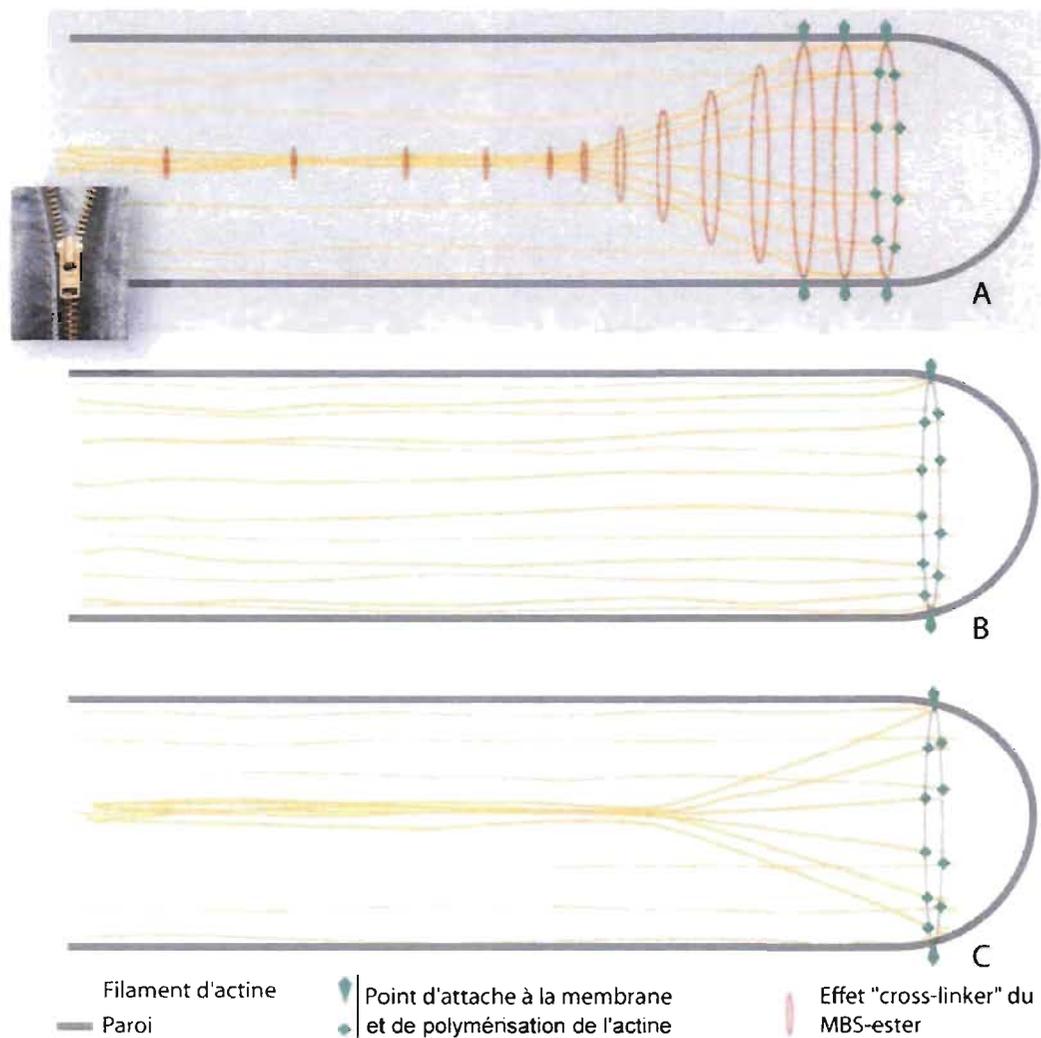
une concentration de MBS-ester optimale pour le maintien de l'organisation de l'actine (Fig. 19.B). Des concentrations inférieures mènent à un marquage faible, probablement dut à une mauvaise préservation des filaments. Des concentrations supérieures mènent, elles, à une désorganisation trop importante des filaments dut à l'effet « cross-linker » et paradoxalement à un marquage également plus faible.

#### **2.4 Discussion sur l'organisation de l'actine sous-apicale**

Il nous est maintenant possible de décrire des modèles (Fig. 20), en prenant en compte que même utilisé à 10  $\mu\text{M}$ , le MBS-ester induit des artéfacts. Le modèle de base tel qu'observé en microscopie (Fig. 20.B) comprend une zone dénuée d'actine à l'apex et un cylindre d'actine, lieu de demi-tour des gros organelles le long des voies d'actine. Ce cylindre d'actine aurait à son extrémité apicale un front de polymérisation des filaments d'actine (Fig. 20.A). Ce cylindre est suivi d'un cône convergeant en un faisceau central. Un premier artéfact probable est la grande distance située entre le front du cylindre d'actine et l'apex (zone sans actine). Le « gel » progressif du cytosquelette par le MBS-ester précède l'arrêt complet de la croissance qui continue encore tant que le « pool » de vésicules de sécrétion présent à l'apex n'est pas épuisé. Ce décalage dans le temps provoque l'allongement de cette section du tube. Il est donc probable que dans le cas réel (Fig. 20.B et C) le cylindre d'actine soit beaucoup plus proche de l'apex. Il est également probable que le cône d'actine soit lui aussi au moins en partie dut à l'action du MBS-ester. L'effet «cross-linker» de ce produit tend à rassembler les filaments d'actine en un gros faisceau central; il a par ailleurs été suggéré que les filaments d'actine sont liés à la membrane au niveau du cylindre (Cardenas et al. 2005); dans ce modèle, le MBS-ester agirait tel un «zipper» en regroupant les filaments d'actine en un faisceau central, jusqu'à ce que la tension des filaments due à leur ancrage probable à la membrane (au niveau du cylindre) l'en empêche, créant ainsi un cône de filaments (Fig. 20.B). Ce modèle supporte donc

l'hypothèse de l'ancrage de l'actine à la membrane au niveau du cylindre d'actine. Dans le même ordre d'idées, le cylindre d'actine, qui selon Lovy-Wheeler et al. (2005) s'étend sur une distance de 1 à 10  $\mu\text{m}$ , pourrait lui aussi être un constituant surestimé de la zone sous-apicale. Si les filaments d'actine sont polymérisés à cet endroit et sont liés à la membrane, alors la combinaison d'un arrêt progressif de la croissance et de la proximité des filaments pourrait sous l'effet du MBS-ester allonger l'anneau (directement situé sous l'apex) en un cylindre s'étendant sur une section mesurant jusqu'à 10  $\mu\text{m}$  (Fig. 20.A).

Déterminer les structures dues aux artéfacts et celles qui sont réelles reste cependant le principal déficit, quelque soit le type de microscopie utilisé et les structures observées. Ainsi, si le cône d'actine et le gros faisceau central semblent être des artéfacts à la lumière des effets du MBS-ester, ils corréleraient cependant tous deux parfaitement avec le processus de flux vésiculaire en fontaine inversée (les vésicules et organelles arrivent en zone sous-apicale par le cortex cellulaire et repartent par le centre du tube (Fig. 1)) tel qu'observé en DIC. L'observation en microscopie à fluorescence (Fig. 19.B) de la section du cône révèle aussi bien des filaments corticaux (arrivée des vésicules et des organelles) que le cône lui-même, convergeant en un faisceau central (retour des organelles). Le modèle réel pourrait donc être assez proche de celui que nous pouvons observer avec l'utilisation de 10  $\mu\text{M}$  MBS-ester (Fig. 20.C). Ce modèle pourrait faire appel à des « cross-linker » présents dans le tube pollinique pour assurer le maintien de faisceaux centraux assurant le retour des organelles vers la partie distale du tube (mécanisme de fontaine inversée). Les voies de retour auraient donc un composant assurant leur agglomération au centre du tube. Ceci nécessiterait là encore l'ancrage des filaments d'actine à la membrane pour assurer la tension des filaments nécessaire à cette séparation organisée entre les voies corticales (aller) et les voies centrales (retour).



**Figure 20** : Modèles de l'organisation du cytosquelette d'actine. A. Modèle de type « zipper » de l'organisation des filaments d'actine construit d'après l'observation en microscopie à fluorescence, lors de l'ajout de  $10\mu\text{M}$  MBS-ester. Le MBS-ester regroupe les filaments en un faisceau central, jusqu'à un point critique où la tension des filaments due à leur ancrage probable à la membrane (losanges verts) empêche leur regroupement. Créant ainsi un cône. Le cylindre d'actine s'étend sur environ  $5\mu\text{m}$  du fait du caractère progressif de l'action du MBS-ester et de l'arrêt de la croissance. Le grisé souligne le fait que contrairement aux deux autres modèles, celui-ci correspond au cas observé directement en fluorescence. Il ne s'agit donc pas d'une organisation hypothétique. B,C. Modèles suggérés de ce que serait l'organisation du cytosquelette d'un tube pollinique non affecté par les étapes de fixation et de marquage. L'anneau de polymérisation et de point de liaison à la membrane correspond à une section plus courte et est situé plus proche de l'apex. B. Le gros faisceau central est absent. Dans ce modèle les filaments liés à l'anneau d'ancrage à la membrane sont tous corticaux. C. Application du modèle « zipper » à un tube non traité. Dans ce modèle, les voies de retour sont centrales. Un cône apparaît assurant la transition entre la localisation centrale et l'anneau d'actine sous-apicale.

Dans le contexte de l'actine sous-apicale, une compréhension des mécanismes de demi-tour des organelles le long des filaments d'actine ainsi qu'une identification et une localisation des points d'attache et de polymérisation des filaments à la membrane, pourraient permettre d'élucider l'organisation de l'actine sous-apicale et de discerner les artéfacts de fixation de l'organisation réelle.

L'annexe 2 est constituée du livret écrit pour l'usage du laboratoire. Il est composé d'une introduction générale aux méthodes de fixation et de préfixation (en français) et de trois protocoles (en anglais). Le premier protocole est celui précédemment utilisé au laboratoire. Le deuxième est celui utilisé pour l'article reporté au chapitre 1 et qui constitue certainement la méthode la plus efficace de marquage de l'actine chez le tube pollinique de pavot. Le troisième protocole est une alternative au deuxième, la concentration de glutaraldéhyde y a été augmentée jusqu'à 1% et le MBS-ester a été supprimé. Ce protocole permet de comparer et ainsi déterminer les artéfacts liés au MBS-ester, il ne donne cependant pas d'aussi bon résultats que le protocole numéro 2 car l'intensité du marquage est souvent faible. Ce protocole conduit cependant à l'observation du dense réseau d'actine sous-apical directement situé derrière l'apex appuyant ainsi le fait qu'une longue distance apex – cylindre d'actine est un artéfact dut au MBS-ester.

La conclusion importante de ces marquages de l'actine est qu'il n'existe actuellement pas de protocole parfait pour le marquage de l'actine et qu'il convient de tester différents protocoles afin de comprendre l'organisation des microfilaments. La majorité des expériences impliquant l'étude du cytosquelette ne nécessite cependant pas une telle application. Par exemple, si le but est de tester l'effet d'une drogue ou d'un stress sur le cytosquelette d'actine alors n'importe quel protocole permettant la visualisation de filaments pourrait être utilisé. Dans ce cas le protocole numéro 2 est certainement le meilleur choix car il donne des résultats constants et les filaments ont une orientation

généralement axiale (même en partie sous-apicale), ce qui permet de bien visualiser les désorganisations causées par le traitement (l'effet d'un traitement induit généralement une désorganisation des filaments qui perdent leur orientation axiale au profit d'une orientation aléatoire ou transversale. Un protocole comme celui précédemment utilisé dans lequel les filaments sous-apicaux sont orientés aléatoirement même dans le témoin ne permettrait donc pas de visualiser l'effet du traitement). À l'inverse, dans le contexte d'une compréhension générale de l'organisation du cytosquelette dans des tubes polliniques vivants, il sera sûrement nécessaire de combiner du marquage après fixation chimique à du marquage basée sur des ABPs fusionnées à la GFP afin de comparer les différents résultats obtenus.

### **Références**

Cardenas L, Lovy-Wheeler A, Wilsen KL, Hepler PK (2005) Actin polymerization promotes the reversal of streaming in the apex of pollen tubes. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 61: 112-27.

Chen CY, Wong EI, Vidali L, Estavillo A, Hepler PK, Wu HM, Cheung AY (2002) The regulation of actin organization by actin-depolymerizing factor in elongating pollen tubes. *Plant Cell* 14: 2175-2190.

Geitmann A, Emons AMC (2000) The cytoskeleton in plant and fungal cell tip growth. *Journal of Microscopy-Oxford* 198: 218-245.

Holweg CL (2006) Living markers for actin block myosin-dependent motility of plant organelles and auxin. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 64: 69-81.

Lovy-Wheeler A, Kunkel JG, Allwood EG, Hussey PJ, Hepler PK (2006) Oscillatory increases in alkalinity anticipate growth and may regulate actin dynamics in pollen tubes of lily. *Plant Cell* 18: 2182-2193.

Lovy-Wheeler A, Wilsen KL, Baskin TI, Hepler PK (2005) Enhanced fixation reveals the apical cortical fringe of actin filaments as a consistent feature of the pollen tube. *Planta* 221: 95-104.

## **Chapitre 3**

### **Résultats complémentaires**

#### **Études structurales du cytosquelette**

##### **Essais *in vivo***

##### **Utilisation de *Lilium orientalis***

## **Préambule**

Ce chapitre regroupe des études qui, du fait de leur isolement ou de leur absence de résultats concluants, n'ont pas encore été inclus dans un article. Elles ont cependant toutes été conduites dans le cadre général du mémoire, c'est-à-dire le rôle du cytosquelette chez le tube pollinique. L'ensemble de ces données est présenté ici à des fins de référence pour de futurs travaux des membres du laboratoire.

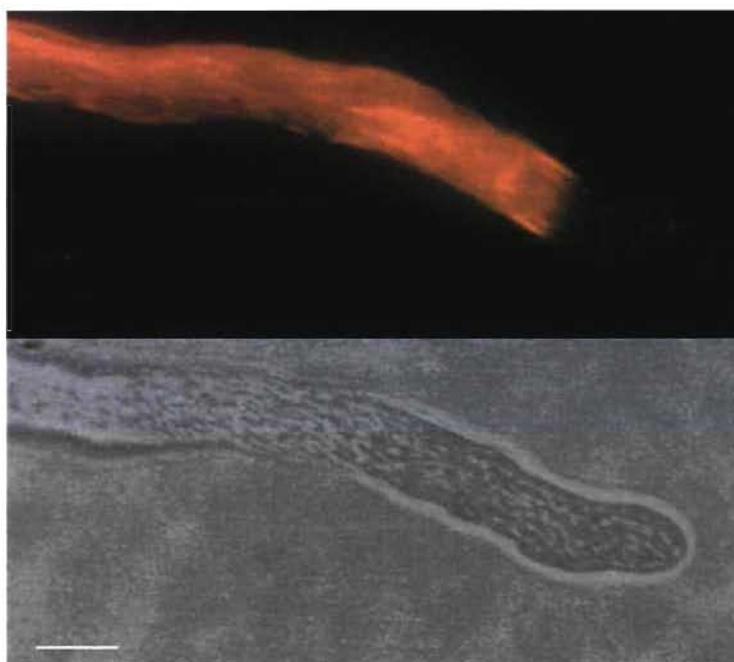
### **3.1 Le rôle du cylindre d'actine sous-apicale dans la croissance et le maintien de la forme du tube pollinique**

Le cylindre d'actine correspond à l'extrémité apicale du cytosquelette d'actine. Son extrémité apicale correspond probablement à un front de polymérisation tandis que sa partie distale se regrouperait progressivement en faisceaux. Sous l'effet du MBS-ester la polymérisation de l'actine cesse et le cylindre d'actine n'avance plus. Cet effet du MBS ester sur les filaments d'actine nous a conduit à l'utiliser dans différentes expériences.

#### *Le cylindre d'actine et la croissance du tube pollinique*

L'utilisation de MBS-ester à faible concentration (10 $\mu$ M) pendant un temps relativement long (15 à 20 minutes) provoque un fort éloignement du cylindre d'actine derrière l'apex du tube pollinique (Fig. 21) (voir chapitre 2). Cette observation pourrait s'expliquer facilement par le « pool » de vésicules présent à l'apex et qui, même après l'arrêt de l'avancement du cytosquelette d'actine sous l'effet du MBS-ester, continuerait leur exocytose en suivant le gradient apical de calcium assurant ainsi l'expansion cellulaire. Quand le « pool » est épuisé, la croissance s'arrêterait définitivement. Ce résultat suggère

donc que le cylindre d'actine, normalement situé directement derrière l'apex, n'est pas indispensable à l'élongation du tube. Cette observation pourrait alors nuancer le rôle suggéré du cytosquelette d'actine dans la force de croissance du tube pollinique (Chapitre 1).



**Figure 21** : Effet du MBS-ester (utilisé à  $10\mu\text{M}$ , 10 à 20 minutes avant la fixation) sur la distance entre le cylindre d'actine et l'apex. Les pointillés indiquent la localisation de l'apex. Haut : marquage des filaments d'actine avec rhodamine-phalloïdine. Bas : microscopie en champ clair du même tube pollinique. Bar=  $8\mu\text{m}$

Cependant l'utilisation d'une vidéo nous a permis d'établir que la croissance s'arrêterait 10 minutes après l'ajout de  $10\mu\text{M}$  MBS-ester, tandis que le flux vésiculaire s'arrêterait seulement 20 minutes après. Ceci suggère donc à l'inverse que la croissance s'arrête malgré la présence du transport vésiculaire et donc de l'exocytose. L'arrêt de la

croissance pourrait donc être induit par l'arrêt des processus dynamiques (polymérisation et dépolymérisation) du cytosquelette.

L'éloignement observé entre le cylindre d'actine et l'apex nous permet actuellement d'affirmer uniquement que la proximité immédiate de l'un et de l'autre n'est pas indispensable à la croissance. Ce résultat vient contredire des observations précédentes qui appuient l'importance de la présence d'actine F directement sous l'apex pour permettre la croissance apicale (Ketelaar et al. 2003; Miller et al. 1999). Le MBS-ester nous permet de découpler l'avancée de l'apex de celui du cylindre d'actine, cet effet est un résultat très encourageant pour les études du rôle mécanique du cytosquelette. Il est cependant indispensable de parvenir à différencier les deux rôles du cytosquelette (force mécanique et transport des vésicules) pour pouvoir caractériser la part mécanique dans la croissance du tube pollinique. L'utilisation de nouvelles vidéos permettrait d'observer précisément le décalage dans le temps entre l'arrêt de la croissance et l'arrêt du flux cytoplasmique et ainsi comprendre le lien existant entre les deux. La BDM immobilise les myosines et donc le flux vésiculaire. L'utilisation de ce composé seul et combiné avec le MBS-ester permettrait de discriminer le rôle du flux vésiculaire de celui uniquement mécanique du cytosquelette d'actine, dans l'avancée de l'apex.

Dans le cadre de cette étude nous avons tenté d'évaluer de manière indirecte l'action mécanique du cylindre d'actine. Nous avons fait pousser du pollen en milieu liquide et en agarose 1% et 3%. Suite à un traitement au MBS-ester à 10 $\mu$ M pendant 20 minutes, les tubes polliniques ont été fixés et traités à la rhodamine-phalloïdine. En superposant les images DIC et en fluorescence, nous avons comparé pour chaque milieu la distance entre le cylindre d'actine et l'apex (Fig. 22 A-F). Notre hypothèse était que si le cylindre d'actine permet de pousser l'apex vers l'avant, alors la distance entre les deux (due au MBS-ester) devrait diminuer dans des milieux résistants (agarose 1% et 3%). Nous n'avons cependant observés aucune différence entre les trois milieux. Une mesure précise effectuée sur un nombre significatif de tubes pour chacun des milieux devrait cependant être effectuée. Ce

résultat pourrait donc suggérer que le cylindre d'actine n'est pas impliqué dans la poussée mécanique de l'apex, mais le caractère indirect de l'étude (variations du milieu extérieur) la rend cependant moins fiable qu'un traitement direct du cytosquelette. Cependant, si ce résultat est vérifié, il soulève la problématique suivante : comment la légère dégradation de l'actine par la latrunculine B permet-elle de réduire la capacité à croître en agarose (Fig. 22 du chapitre 1) si la partie la plus apicale du cytosquelette d'actine n'est pas impliquée?

Le MBS-ester est donc un produit utile pour l'étude des fonctions du cylindre d'actine car il permet de découpler l'avancée de l'apex et du cylindre d'actine, mais il conviendra de l'utiliser en combinaison avec des vidéos ou de la BDM afin de pousser plus loin l'investigation du rôle mécanique du cylindre d'actine.

*Le rôle du cylindre d'actine dans le maintien de la forme apicale du tube pollinique.*

Vidali et al. (2001) ont montré que la polymérisation de l'actine pouvait être critique pour le maintien du diamètre du tube pollinique. L'organisation cylindrique de l'actine sous-apicale suggère un autre rôle éventuel : déterminer et maintenir la forme de la section nouvellement formée de cellule. La section située directement à l'apex possède une paroi souple (Parre and Geitmann 2005). La position du cylindre d'actine, à la transition entre l'apex et la partie plus rigide du tube suggère qu'il pourrait être la structure qui détermine initialement le diamètre du tube pollinique. Cette hypothèse ne repose sur aucune donnée et il est très probable qu'à l'inverse, le cylindre d'actine, étant probablement lié à la membrane, tiens sa forme de celle de la paroi. Nous avons cependant souhaité tester cette possibilité.

La longue section présente entre le cylindre d'actine et l'apex lors de l'ajout de MBS-ester garde un diamètre très semblable à celui de la partie distale du tube (Fig. 22 A-F). Ceci suggère que le cylindre d'actine n'est pas le composant cellulaire qui détermine et

maintient le diamètre du tube nouvellement formé. Cependant, une observation plus précise a révélé de légères augmentations ou dépressions du diamètre localisées à l'extrémité apicale du cylindre d'actine (Fig. 22 G-J). Cette observation montre malgré tout que le cylindre d'actine a une légère influence sur la forme de la cellule. Les dépressions du diamètre de la section apicale (Fig. 22 G-I) suggèrent, elles, que le cylindre d'actine pourrait résister aux forces de compression du milieu extérieur ou qu'à l'inverse, le cylindre d'actine pourrait exercer une tension suffisante pour tirer la paroi vers l'intérieur.



**Figure 22** : Morphologie de l'apex du tube pollinique suite à l'utilisation de  $10\mu\text{M}$  MBS-ester. Toutes les images sont une combinaison d'une photo prise en DIC et d'une photo de marquage de l'actine avec rhodamine-phalloïdine. A-F. La section située entre le cylindre d'actine et l'apex garde un diamètre semblable à celui de la partie distale malgré l'absence de cytosquelette d'actine. G-J. De légères dépressions ou gonflements sont cependant visibles à l'extrémité apicale du cylindre d'actine. Bar =  $8\mu\text{m}$ .

### *Le rôle du cylindre d'actine dans la direction de croissance du tube pollinique*

De part sa forme cylindrique et sa localisation, nous avons supposé que le réseau d'actine sous-apical pourrait canaliser et diriger précisément les vésicules à l'apex. Cette hypothèse reposait en partie sur le fait qu'un dense réseau d'actine corticale agit tel un rempart à l'exocytose (Raudaskoski et al. 2001). Si le cylindre d'actine est situé directement sous l'apex et si l'exocytose ne peut avoir lieu en présence d'une grande quantité de filaments d'actine, alors les vésicules seraient obligées d'atteindre précisément l'extrémité apicale du cylindre d'actine pour être sécrétées; elles seraient ainsi précisément dirigées à l'apex. Dans ce contexte, les changements de direction du tube pollinique pourraient être dus à des variations du lieu d'exocytose induit par des changements de conformation du cylindre d'actine. Afin de tester cette hypothèse nous avons observé le comportement des tubes dont le cylindre d'actine reste en arrière suite à l'action du MBS-ester. Un grand nombre de ces tubes gardaient leur capacité à tourner même en absence de cytosquelette d'actine à l'apex (Fig. 21). Ces résultats sont en accords avec les observations, effectuées par la suite, sur le rôle du cytosquelette dans la direction de croissance du tube pollinique (chapitre 1).

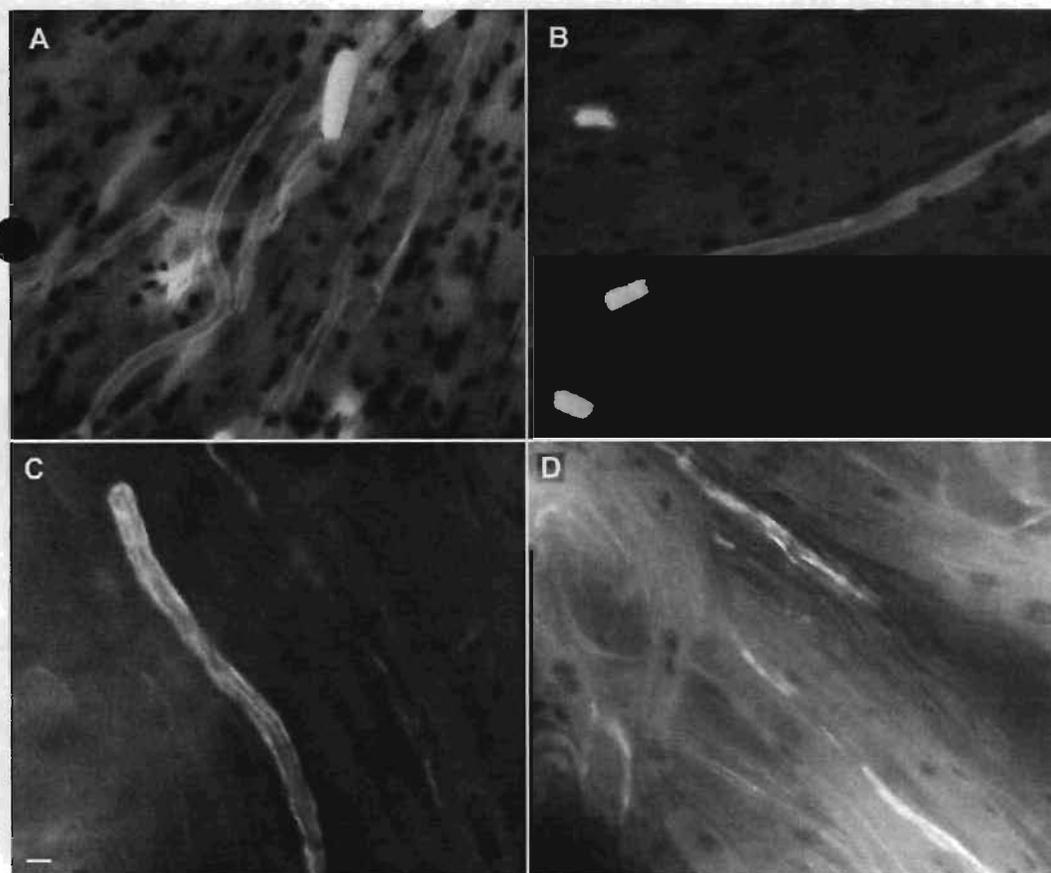
### **3.2 Marquage de la callose et des filaments d'actine in vivo**

La grande capacité du pollen à germer in vitro est une des caractéristiques qui en font un modèle cellulaire si souvent utilisé pour l'étude des mécanismes de la croissance apicale. Les conditions in vitro étant cependant une approximation de celles in vivo, nous nous sommes intéressés dès le début de notre étude à pouvoir visualiser le pollen in vivo, c'est-à-dire lors de leur croissance à l'intérieur d'un pistil.

Les fleurs ont des styles de deux types différents : Les styles pour lesquels la voie de passage des tubes polliniques est constituée d'un tissu transmissif solide, appelés styles

pleins (ex : *Papaver rhoeas*, *Solanum chacoense*) et les styles creux (ex : *Lilium longiflorum*). Ces derniers ont un canal central (rempli d'écudats) dans lequel poussent les tubes polliniques depuis le stigmate jusqu'à l'ovule. Il est très probable que les tubes polliniques aient besoin de moins de force de croissance dans le cas de styles creux que dans le cas de style pleins. Notre objectif était donc d'observer les différences dans l'organisation du cytosquelette du tube pollinique chez un groupe d'espèce à style plein et chez un groupe d'espèce à style creux. Et ce, aussi bien in vitro qu'in vivo. Nous avons récolté du pollen de 25 espèces dans le jardin botanique de Montréal. Nous souhaitions pour chaque espèce tester la capacité du pollen à germer et déterminer la nature du style (creux ou plein). Cette approche a été abandonnée par la suite (voir plus bas), ces informations ne sont donc disponibles que pour certaines espèces (Annexe 3). Parallèlement à cette récolte, nous avons tenté de visualiser le cytosquelette du pollen in vivo. Pour vérifier si un marquage des tubes polliniques poussant à l'intérieur des tissus du pistil est réalisable avec un fluorochrome, du marquage de la callose à l'aniline bleue a d'abord été préféré à du marquage du cytosquelette, car il est rapide et fiable. Des essais de marquage sur des tranches longitudinales de style pollinisé ont été réalisés chez *Solanum* et *Hortensia* (du fait de leur facilité de manipulation et de leur disponibilité) et nous ont permis d'observer des tubes à l'intérieur du tissu transmissif (Fig. 23 A.B). Les tranches étaient soit suffisamment fines pour être montées sur lame directement soient écrasées entre lame et lamelle. Ceci nous a encouragé à tester du marquage de l'actine dans les mêmes conditions chez *Solanum* (Fig. 23 C.D). Comme l'actine est une structure peu stable nous avons choisi de soumettre le style entier à la solution de fixation. Le temps de fixation a été augmenté à une heure en conséquence. Après un lavage de 30 minutes, des coupes longitudinales du style ont été effectuées. Après trois lavages de 30 minutes chacun, la rhodamine-phalloïdine a été ajoutée « overnight ». Après cinq autres lavages de 30 minutes, les tranches de styles ont été montées sur lame. Le résultat de ce marquage s'est avéré positif, les filaments étaient visibles dans les tubes polliniques. Cependant l'épaisseur des tranches et l'auto-fluorescence du tissu empêchait une visualisation suffisante pour le but

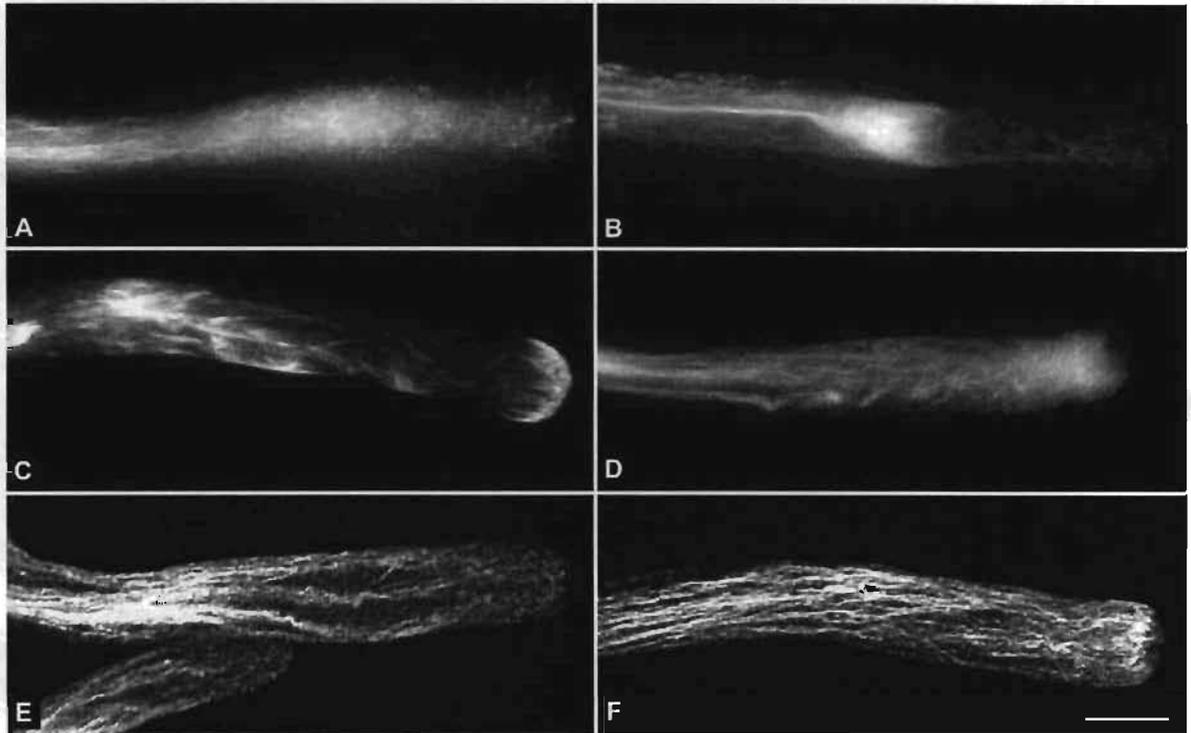
de notre étude (Fig. 23 C.D). Ce résultat est cependant encourageant car il montre qu'il nous est possible de visualiser le cytosquelette des tubes polliniques *in vivo*. Pierson et al. (1986) ont réalisé ce type de marquage il y a une vingtaine d'années chez du lys germant *in vivo* et ont observé de denses structures d'actine étoilées réparties dans différentes sections du tube. Ces structures ne se retrouvent pas chez des tubes polliniques germant *in vitro*, ce qui suggère une influence du tissu transmissif sur l'organisation de l'actine. Des méthodes permettant l'obtention de tranches fines (enrobage avec de la paraffine...) et l'utilisation de microscopie confocale pourrait nous fournir de bons résultats chez des espèces telles que *Solanum chacoense* ou *Papaver rhoeas*.



**Figure 23** : Marquage fluorescent de tubes polliniques germant *in vivo* chez *Solanum chacoense*. A.B. Marquage à l'aniline bleue de la callose. C.D. Marquage des filaments d'actine (rhodamine-phalloïdine). Barre= 8µm.

### 3.3 Marquage de l'actine chez *Lilium orientalis*

Notre protocole de marquage de l'actine a été mis au point chez le pavot, nous avons par conséquent souhaité tester sa validité chez une autre espèce modèle du laboratoire : *Lilium longiflorum*. Nous avons observé que 10 ou 20 $\mu$ M MBS-ester n'est pas une concentration suffisante pour la préservation des filaments d'actine chez le lys (Fig. 24 A). Une forte concentration (200 $\mu$ M) induit cependant comme chez le pavot des gros faisceaux d'actine présentant des ondulations ainsi qu'un réseau sous-apical désorganisé (Fig. 24 D). 50 $\mu$ M est la concentration de MBS-ester qui a amené les résultats les plus proches de ceux obtenus chez le pavot (Fig. 24 B), Les structures étaient cependant bien moins organisées. Avec cette concentration nous avons pu observer l'éloignement habituel entre le réseau d'actine sous-apicale et l'apex chez certains tubes. L'actine sous-apicale bien que très désorganisée formait un cône suivi d'un gros faisceau central. Les voies d'actine étaient également très ondulées (comme généralement observé avec l'utilisation de fortes concentrations de MBS-ester). De plus, un autre type d'organisation était aussi souvent présent dans la lame; dans ces tubes, les filaments d'actine s'étendaient jusqu'à l'apex (Fig. 24 C). Cette organisation pourrait être due à un arrêt de la croissance du tube pollinique dut au MBS-ester. Nous avons également testé chez cette espèce le protocole de marquage de l'actine tel que décrit par Lovy-Wheeler et al. (2005). Bien que nous n'ayons pas obtenus de résultats semblables aux leurs (cylindre sous-apical formés de filaments axiaux et bien distincts les uns des autres), ce protocole a donné des résultats concluants (filaments bien marqués en partie distale et sous apicale, actine absente de l'apex). Là encore, plusieurs types d'organisation ont été observés : une organisation proche de celle obtenue par Lovy-Wheeler et al., 2005 présentant un cylindre d'actine bien marqué et des filament axiaux et relativement droit en partie distale (Fig. 24 F) et une organisation dans laquelle l'actine sous-apicale était plus faiblement marquée et ou généralement les filaments d'actine distaux se séparaient en deux ou trois faisceaux principaux (Fig. 24 E).



**Figure 24** : Différents essais de fixations et de pré-fixations pour le marquage de l'actine (rhodamine-phalloïdine) chez *Lilium orientalis*. A. Préfixation : 20 $\mu$ M MBS-ester 20 minutes avant la fixation aux aldéhydes. B.C. Préfixation : 50 $\mu$ M MBS-ester 20 minutes avant la fixation aux aldéhydes. D. Préfixation : 200 $\mu$ M MBS-ester 20 minutes avant la fixation aux aldéhydes. E.F. Protocole de marquage de l'actine selon Lovy-Wheeler et al. (2005). barre=20 $\mu$ m

## Références

Ketelaar T, de Ruijter NCA, Emons AMC (2003) Unstable F-actin specifies the area and microtubule direction of cell expansion in *Arabidopsis* root hairs. *Plant Cell* 15: 285-292.

Miller DD, de Ruijter NCA, Bisseling T, Emons AMC (1999) The role of actin in root hair morphogenesis: studies with lipochito-oligosaccharide as a growth stimulator and cytochalasin as an actin perturbing drug. *Plant Journal* 17: 141-154.

Parre E, Geitmann A (2005) Pectin and the role of the physical properties of the cell wall in pollen tube growth of *Solanum chacoense*. *Planta* 220: 582-92.

Pierson ES, Derksen J, Traas JA (1986) Organization of microfilaments and microtubules in pollen tubes grown in vitro or in vivo in various angiosperms. *European Journal of Cell Biology* 41: 14-18.

Raudaskoski M, Åström H, Laitinen E (2001) Pollen tube cytoskeleton: Structure and function. *Journal of Plant Growth Regulation* 20: 113-130.

## Discussion et perspectives

Le but initial de nos recherches durant ces deux ans était d'étudier les composants cellulaires impliqués dans la force de croissance du tube pollinique. Nous nous sommes cependant concentrés sur l'étude du cytosquelette. Si il est bien établi que la turgescence joue un rôle fondamentale dans la force de croissance et qu'il est à l'inverse peu probable que la polymérisation des filaments du cytosquelette puisse générer une force de manière directe, nous avons cependant tenté de déterminer si le cytosquelette pourrait être impliqué dans les étapes de la croissance du tube pollinique qui nécessitent une force de percée (pénétration du stigmate, croissance dans le tissu transmissif). Nos expériences ont donc été conduites dans la perspective d'une force mécanique probablement générée à l'aide des filaments d'actine et/ou les microtubules. Elles ont certes fourni des résultats sur ce sujet mais plus généralement, elles nous ont permis de mieux cerner la manière dont le cytosquelette influence le comportement du tube lorsque celui-ci rencontre un obstacle. Nous nous sommes longuement intéressé à l'actine aussi bien au niveau structural que fonctionnel. À l'inverse notre étude des microtubules s'est limitée au niveau fonctionnel car leur organisation semble mal préservée en fluorescence ce qui rend les études structurales difficiles. Nous avons eu recours aux drogues latrunculine B et orysaline pour un grand nombre d'expériences, et nous avons mis en relation l'effet de ces drogues sur l'organisation du cytosquelette tel qu'observé en microscopie à fluorescence. Nous avons, par conséquent, déployés beaucoup d'efforts au début de ma maîtrise afin d'améliorer les protocoles existant de marquage du cytosquelette. Nous avons ainsi été en mesure de

visualiser l'effet de drogues telles que l'orysaline ou la latrunculine B sur l'organisation du cytosquelette.

Nous avons utilisé des milieux de croissance solidifiés avec de l'agarose afin de réaliser trois séries d'expériences : 1) croissance dans des milieux ayant des résistances physiques différentes. 2) Test de pénétration d'obstacle *in vitro*. 3) Étude de la direction de croissance.

Ces trois types d'expériences nous ont fourni des données complémentaires sur le comportement des tubes polliniques lorsqu'ils doivent exercer une force de croissance. La première et la troisième nous ont permis d'étudier les deux caractéristiques indispensables à la pénétration d'un obstacle : la force de croissance et le maintien de la direction de croissance. Le test de pénétration *in vitro* a, lui, confirmé ces résultats en mimant la pénétration d'un obstacle tel que la surface du stigmate.

Nous avons ainsi observé que les filaments d'actine semblent contribuer à la génération d'une force de croissance permettant aux tubes polliniques de croître dans des milieux de croissance solidifiés avec de l'agarose (jusqu'à 3%). Les microtubules ne semblaient, eux, avoir aucun rôle dans ce processus. À l'inverse, les microtubules auraient un rôle dans la direction de croissance du tube pollinique (avec une dégradation des microtubules menant à un plus grand maintien de la direction de croissance) alors que les microfilaments d'actine n'auraient, eux, aucun rôle visible dans cet aspect.

L'utilisation de la latrunculine B avec le test de pénétration *in vitro* montre que la dégradation des microfilaments provoque une baisse du taux de pénétration de l'obstacle. Ceci est cohérent avec le rôle suggéré des filaments d'actine dans la force de croissance des tubes polliniques. À l'inverse, l'utilisation d'orysaline ne provoque aucune baisse du taux de pénétration et même une légère hausse qui bien que non significative est apparue dans

chaque répétition de l'expérience. Cette hausse corrèlerait avec l'effet positif de la dégradation des microtubules sur le maintien de la direction de croissance. Si les tubes ont tendance à moins dévier lorsqu'il rencontre un obstacle, il est normal que le taux de pénétration augmente.

Ces trois séries d'expériences offrent donc pour la première fois des indications sur le rôle mécanique du cytosquelette des tubes polliniques lors de la pénétration d'obstacles (tels que le stigmate).

Nous avons consacré quelques semaines à l'amélioration de nos protocoles de marquage des microtubules et des filaments d'actine afin d'obtenir des structures suffisamment préservées chez les tubes polliniques de *Papaver rhoeas*. La manipulation des cellules lors des différentes étapes de marquage amènent de nombreux artéfacts qui rendent actuellement difficile la détermination de l'organisation des filaments. Nous n'avons donc pas pu baser nos améliorations sur la connaissance de la structure réelle du cytosquelette. Nous avons donc cherché à connaître l'effet des différents composés utilisés afin de déterminer les artéfacts qu'ils peuvent créer et ainsi choisir quels traitements induisent le moins d'artéfacts et sont donc les plus efficaces.

Si nous sommes parvenus à observer des microtubules, il nous est actuellement impossible de conclure si le résultat visible est proche de la réalité. Contrairement à l'actine, les microtubules de la moitié apicale du tube pollinique semblent dégradés et aucun réseau dense de microtubules n'est visible sous l'apex. Si cette organisation est proche de la réalité, elle corrèlerait avec la différence de fonction entre actine et tubuline dans la force de percée du tube pollinique observée avec nos tests précédents. Cette organisation des microtubules à l'apex du tube pollinique de *Papaver rhoeas* diffère de celle visible à l'apex des poils racinaires dans lesquels des microtubules orientés aléatoirement sont trouvés jusqu'à l'apex (Ketelaar et Emons 2001). Cette distribution semble également varier dans les tubes polliniques en fonction des espèces et des articles. Chez *Nicotiana tabacum*, la distribution des microtubules est parfois décrite jusqu'à l'apex

(Del Casino et al. 1993) tandis que Raudaskoski et al. (2001) décrivent une organisation semblable à celle que nous observons chez *Papaver rhoeas*.

Le protocole de marquage de l'actine nous permettait déjà d'observer des filaments. Cependant des publications récentes ont proposé des modèles d'organisation de l'actine différents de celui visible avec notre précédent protocole, particulièrement en partie apicale. L'étude des effets des différents traitements nous a conduit à mettre en cause la préfixation au MBS-ester comme facteur influençant l'organisation des filaments d'actine. L'utilisation d'un cross-linker tel que le MBS-ester comme pré-fixatif semble indispensable à la préservation des filaments d'actine au travers des étapes de fixation. Nous avons cependant pu observer que, même utilisé à faible concentration, ce composé provoque un regroupement des filaments axiaux en faisceaux (présentant des ondulations lors de l'utilisation de fortes concentrations de MBS-ester) et un réseau dense et désorganisé d'actine F à l'apex.

L'optimisation du protocole de marquage de l'actine a été effectuée chez *Papaver rhoeas*, un essai réalisé avec *Lilium orientalis* a conduit à des structures mal préservées, suggérant qu'il sera nécessaire d'optimiser le protocole pour chaque espèce utilisée. La concentration de MBS-ester ou le type de cross-linker à utiliser semble cependant le facteur le plus critique. L'utilisation de sulfo-EGS au lieu de MBS-ester a donné des structures ne présentant pas les artéfacts lié au MBS-ester et ayant une préservation satisfaisante des filaments. Là encore, si ce produit s'est avéré efficace chez le lys, son utilisation chez le pavot n'a pas permis une préservation suffisante des filaments.

Le modèle établi pour l'organisation des filaments d'actine chez *Papaver rhoeas* semble cohérent avec l'hypothèse d'une force mécanique générée à l'aide de l'actine. Plus que le dense réseau d'actine désorganisé décrit dans de nombreuses publications, des filaments axiaux formant à leur extrémité un anneau situé directement sous l'apex et ayant probablement des points d'attache à la membrane seraient susceptibles de stabiliser l'apex du tube vers l'avant. Cette poussée pourrait résulter de la rigidité des microfilaments et de

la polymérisation de l'actine au niveau de l'anneau grâce à des protéines telles que les formines. À l'inverse l'absence de réseau de microtubules à l'apex corrèle avec l'absence de rôle de ceci dans la force de croissance du tube pollinique.

Un de nos objectifs principaux était de mettre en relation les rôles mécaniques du cytosquelette observés (grâce aux différents tests) avec la structure observée en microscopie en fluorescence. De part le peu d'informations offert par le marquage des microtubules, nous nous sommes surtout intéressés au cytosquelette d'actine. Le MBS-ester s'est révélé être un outil très prometteur pour l'étude du rôle mécanique des microfilaments d'actine. Son effet « cross-linker » permet de découpler la croissance apicale de celle du cytosquelette sur une courte distance et/ou une courte durée. Il nous a tout d'abord permis d'observer que la présence du cylindre d'actine directement sous l'apex n'est pas indispensable à la croissance apicale (contrairement à ce que l'on pensait), car même lors de l'arrêt de l'avancement du cytosquelette d'actine, le tube est encore capable de croître sur une distance allant jusqu'à 25 $\mu$ m. Cette distance ne diminue pas, même lorsque les tubes doivent croître dans des milieux solidifiés avec 1 et 3% d'agarose. Ce résultat contredit donc en partie le rôle mécanique de l'actine suggéré par l'utilisation de latrunculine B en combinaison avec le test de croissance en milieu d'agarose et le test de pénétration *in vitro*. Il est cependant difficile de conclure sur cette expérience car nous ne connaissons pas actuellement la manière dont l'actine permet de générer une force de croissance à l'apex et car la distance et/ou la durée de la croissance après l'ajout de MBS-ester est relativement courte.

Il existe une limite importante à nos résultats qui, sans en altérer la validité, rend leur analyse plus complexe. Si nous avons utilisé les deux drogues pour altérer l'une ou l'autre des composantes du cytosquelette, il est cependant probable qu'il y ait des interactions entre microtubules et microfilaments. La dégradation des uns pourrait donc affecter les autres. Afin de tester cette possibilité, nous avons réalisé un test de germination

en présence des deux drogues utilisées séparément puis ensemble. Ceci a montré que l'effet combiné de la dégradation des microtubules et des filaments d'actine est plus dramatique que lorsque les drogues sont utilisées séparément. Ceci suggère donc effectivement des interactions entre microtubules et filaments d'actine. Le marquage fluorescent des microtubules et des filaments d'actine de deux échantillons issus d'un même échantillon traité soit avec de l'orysaline soit avec de la latrunculine B nous a montré que l'organisation et la polymérisation des microtubules dépend de celle des filaments d'actine (l'inverse n'étant pas vrai). Cette dégradation visible du réseau de microtubules apparaît cependant que lors de l'utilisation d'une concentration de latrunculine B très élevée (100 nM) assurant la dégradation complète des filaments d'actine. Si les concentrations utilisées pour nos tests mécaniques (0 à 3 nM) n'ont probablement pas d'effet sur l'organisation des microtubules, il est cependant important de connaître les effets possibles de la dégradation des microfilaments d'actine sur les microtubules. Il est donc important d'envisager le cytosquelette du tube pollinique comme un ensemble plutôt que comme deux composantes indépendantes. Il sera également primordial d'inclure dans cet ensemble les protéines de liaison à l'actine (ABPs), les protéines associées aux microtubules (MAPs) ainsi que le plus possible de protéines régulant la polymérisation, l'organisation et les interactions entre microtubules, filaments d'actine et paroi cellulaire.

L'étude des ABPs est particulièrement importante dans le contexte des recherches sur le rôle de l'actine dans la force mécanique de percée du tube pollinique. La dynamique de polymérisation des filaments d'actine dans la section de l'anneau sous-apical permettrait de comprendre le mécanisme qui permet la poussée vers l'avant de l'apex.

L'étude d'autres protéines régulatrices du cytosquelette telles que celles assurant les interactions entre le cytosquelette et la matrice extra-cellulaire serait aussi indispensable à la compréhension de la structure du cytosquelette *in vivo*. L'ensemble des observations du cytosquelette chez les tubes polliniques ont été réalisées *in vitro* du fait de la complexité des observations de tubes germant dans le tissu transmissif du style. Les modèles établis

d'organisation de l'actine F et des microtubules ne prennent donc pas en compte les signaux extérieurs issus du style ainsi que les interactions cytosquelette/matrice extracellulaire. Nos essais de marquage de l'actine *in vivo* ont cependant été encourageants et il est probable que des améliorations de certaines étapes de l'expérience telles que la finesse des coupes ainsi que l'utilisation de microscopie confocale, permettrait de visualiser le cytosquelette de tubes poussant dans le style.

Une autre limite importante de nos expériences a été la difficulté à lier le rôle du cytosquelette observé grâce à nos tests avec la structure visible en microscopie à fluorescence. Si le marquage sur des tubes fixés chimiquement permet l'observation de filaments bien conservés, il est difficile de comprendre quels rôles peuvent avoir ces structures dans des tubes vivants. Il serait donc intéressant de combiner des tests tels que celui de pénétration *in vitro* avec du pollen transformé avec GFP-ADF afin de visualiser le cytosquelette d'actine sur des tubes polliniques vivants. Ce type d'expérience nous permettrait de visualiser des changements de conformation des microfilaments au moment critique où les tubes polliniques doivent exercer une force afin de percer l'interface entre les deux milieux d'agarose et ainsi comprendre la nature de leur rôle dans la force de croissance.

Lors des premières observations du cylindre sous-apical d'actine, une des hypothèses était qu'il pourrait diriger les vésicules de sécrétions précisément jusqu'à l'apex, car sa densité empêcherait l'exocytose sur le côté du cylindre. Nos tests avec orysaline et latrunculine B ont cependant suggéré que l'actine n'aurait pas de rôle dans la direction de croissance (à l'inverse des microtubules). Il serait intéressant de vérifier si des tubes soumis à un traitement de 10  $\mu$ M MBS-ester gardent leur capacité à tourner pendant la courte durée/distance où il continue à pousser. Cette expérience ferait là encore appel à des transformants (avec GFP-ADF par exemple) afin de visualiser le lieu d'arrêt du cytosquelette sans avoir à procéder aux étapes de fixation et de marquage qui induirait des changements de direction artificiels dus aux nombreuses manipulations.

**Références**

Del Casino C, Li Y, Moscatelli A, Scali M, Tiezzi A, Cresti M (1993) Distribution of microtubules during the growth of tobacco pollen tubes. *Bio Cell* 79: 125-132.

Raudaskoski M, Åström H, Laitinen E (2001) Pollen tube cytoskeleton: Structure and function. *Journal of Plant Growth Regulation* 20: 113-130.

## Annexe 1 : Protocole de marquage des microtubules

### Immunofluorescence label of microtubules in pollen tubes

#### 1. Preparation of solutions to be stored

The following solutions can be stored at room temperature (RT) or at 4°C for a while.

#### Pollen growth medium (GM) after Brewbaker and Kwack

This medium works well for most pollen, except for lily.

*Final composition:* 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 300  $\mu\text{g mL}^{-1}$   $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$   $\text{KNO}_3$ , 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$   $\text{MgSO}_4$ , 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  sucrose

Prepare a 10x concentrated stock solution without sucrose. To prepare 50 ml stock solution, weigh:

- 50 mg  $\text{H}_3\text{BO}_3$
- 150 mg  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- 50 mg  $\text{KNO}_3$
- 100 mg  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

and fill up to 50 ml with ddH<sub>2</sub>O. Solving all the crystals can take a while.

Freeze this stock solution in 1ml aliquots (Eppendorf tubes, labelled "10xBK", placed in plastic bag labeled with your name).

When you need the solution, thaw a 1ml aliquot and transfer it to a 10 ml cylinder, add

- 500 mg sucrose

and fill up to 10 ml with ddH<sub>2</sub>O.

#### PM Buffer

Should not be stored too long.

*Final composition:* 50 mM Pipes, 1 mM EGTA, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH 6.9

Prepare a 10 mM EGTA stock solution (0.38 g EGTA in 100 ml).

Prepare a 10 mM  $\text{MgCl}_2$  stock solution (0.095 g  $\text{MgCl}_2$  in 100 ml).

Weigh:

- 1.512 g Pipes

and add 60 ml ddH<sub>2</sub>O. Dissolve by adding NaOH. Adjust pH to 6.9 by adding HCl.

Add 10 ml of EGTA stock and 10 ml of  $\text{MgCl}_2$  stock solution and bring to 100 ml with ddH<sub>2</sub>O.

## **TBS Buffer**

*Final composition: 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5*

To prepare 100 ml, weigh

- 0.606g Tris
- 0.877g NaCl

Fill up to with 80 ml ddH<sub>2</sub>O

Adjust to pH 7.5 by adding 1M HCl (~950 µl)

Adjust volume to 100 ml.

You can also prepare a 10x stock solution. Store at 4°C.

## **Cold MetOH**

Put a bottle with cold methanol in the freezer at -20°C

## **Mounting medium n-Propyl-gallate**

Prepare 5% n-propyl-gallate in glycerol.

## **Alternative mounting medium p-phenylenediamine**

0.5 % p-phenylenediamine (Free Base; purchased from Sigma)  
in 20 mM Tris, pH 8.8, 90 % glycerol

We prepare this by adding the p-phenylenediamine to the tris/glycerol and dissolving it by bubbling nitrogen through the tube for 3-4 hours. The mounting medium is stored at -20°C. It will turn brown over time and we generally discard once it turns dark brown before making a fresh batch.

## **2. Pollen hydration**

- Take out one or several pollen samples from the freezer. Note the number code of the samples!
- Transfer the appropriate amount of pollen into one corner of a small Petri dish. If the pollen is one large lump, spread it a little bit with the spatula to increase the surface.
- Put the remaining pollen sample back in the freezer in a plastic bag or container marked with your name.
- Wet a piece of towelpaper with warm water and place it in the other corner of the Petri-dish.
- Close the lid and put something a little bit heavy on top to avoid drying out.
- Hydrate this way for 30 min.

### 3. Pollen germination

There are different ways of letting pollen germinate for immunolabel. Three of them are given here:

#### Germination on agarose

- Prepare liquid growth medium (GM) from your stock solution by diluting with ddH<sub>2</sub>O and adding the appropriate amount of sucrose.
- Using your liquid GM, prepare 1ml of 0.5% or 1% agarose GM. Weigh the appropriate amount of low melting agarose, put in an Eppendorf and add 1ml of liquid GM. Place the Eppendorf with the lid open in a small beaker containing some water. Heat several times for few seconds in the microwave oven and shake in between (with the lid closed). Repeat until no agarose grains are visible.
- Prepare a microscope slide with a series of small, round cover slips.
- Place drops of hot agarose GM on round cover slips.
- With a brush pick up some pollen and by knocking the handle against the table, spread pollen on the surface of the agarose.
- Place slide with cover slips in a Petri dish, add a towel soaked with hot water
- Close Petri dish, let incubate for 30 min.
- Add a drop of liquid GM on top of the agarose.
- Incubate until pollen germination is well underway.

#### Germination in agarose

◆ *Note: labelling in agarose (often use for a actin labelling with phalloidin) did not give any results for microtubule labelling. There was fluorescence everywhere on the slide, suggesting that the antibodies are not able to move fast enough in this kind of medium. Longer incubation time for one of the two antibodies could perhaps solve this problem.*

Same procedure as above, but instead of growing on top of the agarose, the pollen is mixed with the agarose. Care has to be taken not to shock the pollen with agarose that is too hot, so temperature needs to be controlled!

- Proceed as above for the preparation of the agarose GM
- Place the Eppendorf with the agarose GM in the Eppendorf-waterbath and let cool to 42°C.
- With a plastic pipette, transfer an appropriate amount of agarose GM to a different Eppendorf that had been kept at the same temperature.
- Add pollen to the Eppendorf, vortex for one or two seconds, and use a large plastic pipette to transfer the pollen containing agarose GM to the round cover slips (see above).

- Place slide with cover slips in a Petri dish and proceed as above.
- Check germination after 60, 90, ... min.

### **Germination in liquid medium**

- Pollen is added to liquid GM placed in a small Erlenmeyer. It is important that the surface of the liquid is big - 4ml medium in a 25 ml Erlenmeyer is a possible combination for example.
- Place the Erlenmeyer in the incubator at 25°C for germination.
- Check germination by transferring a drop of pollen containing medium on a microscope slide.

## **4. Fixation**

Prepare fixative freshly on the day of use: 4% formaldehyde in PM buffer

- Weigh the necessary amount of paraformaldehyde on a balance under the hood.
- Add to the appropriate amount of PM buffer and heat in water bath.
- Do not let boil! Heat (and shake occasionally) until paraformaldehyde is dissolved.
- Let cool.
- Add fixative to pollen.

◆ *Note: the concentration of formaldehyde and the duration of fixation don't seem very critical: The formaldehyde concentration can be taken in a range from 3% to 5% and the pollen can be incubated in the fixative solution for 30 min to 1 hour. 4% formaldehyde for 45 minutes gave good results.*

Depending on the way of pollen has been cultured, the fixative is added in the following way:

### **Pollen in/on agarose:**

- Place big drops of fixation solution in a Petri dish covered with parafilm
- Place wet paper along the wall to keep the atmosphere humid.
- The cover slips are placed with the agarose facing down onto the drops of fixation solution.
- Cover the Petri dish and let incubate for 45 min.

### **Pollen in liquid medium - filter method:**

◆ *Note: the filter method seems to be the most effective. It allows good precision for the incubation times and is easy to use.*

- Prepare small filters: Cut ca. 1cm long cylindrical pieces from blue or yellow pipette tips or 2-3 cm sections of transfer pipets (Fisher 13-711-7). Heat one end on a flame to melt slightly. Press that end on a nylon membrane. Let cool. Cut out the membrane.

- Place the filters in the slots of an Eliza rack.
- Transfer pollen containing liquid GM into filter.
- Let liquid flow out by pressing the filter on ply wipes and replace immediately by fixation solution.
- Incubate for 45 min.

### **Pollen in liquid medium - centrifugation method:**

- Transfer pollen containing liquid GM with a big plastic pipette to Eppendorf caps.
- Centrifuge at highest RPM for 30 to 60 seconds
- Check whether the pollen has sedimented, if not, centrifuge again.
- Discard supernatant using a pipette.
- Add fixation solution and resuspend pollen carefully by gently sucking into the big plastic pipette.
- Incubate for 30 min.

## **5. Microtubule label**

- Prepare the necessary amount of 2% cellulysin (*Calbiochem*) in PM buffer.
- Make sure that there is cold methanol in the freezer.

Transfer the pollen from one solution to the next in the same way you did the fixation. The following series of solutions needs to be applied:

- |  |                                    |
|--|------------------------------------|
| ➤ PM buffer  | 2 x 5 min, RT                      |
| ➤ 2% cellulysine in PM buffer  | 5 to 10 min, <b>dark</b> , RT      |
| ➤ PM buffer  | 2 x 5 min, RT                      |
| ➤ Cold methanol (-20°C)  | 5 min, <b>-20°C</b>                |
| ➤ TBS buffer + 2% BSA  | 2 x 5 min, RT                      |
| ➤ Primary antibody in TBS buffer + 2% BSA<br>(antibody 1 at 1/200)   | 1hr30 to overnight RT              |
| ➤ TBS buffer + 2% BSA  | 3 x 5 min, RT                      |
| ➤ Secondary antibody in TBS buffer + 2% BSA<br>(antibody 2 at 1/100) | 1 to 2h, RT or 37°C<br><b>dark</b> |
| ➤ TBS buffer + 2% BSA  | 4 x 5 min, RT, <b>dark</b>         |

- Primary antibody = anti- $\alpha$ -tubulin (bovine) (mouse igG1, monoclonal 236-10501) (*Molecular Probes*)
- Secondary antibody = Alexa Fluor 594 (goat anti-mouse IgG (H+L)) (*Molecular Probes*)

♦ *Note:* We tested a combination of 1% glucanase and 1% pectinase instead of cellulysin, but this digestion treatment lead to the degradation of microtubules. However, decreasing the digestion time from 5 minutes to 3 minutes gave slightly better results suggesting that these enzymes do affect microtubules.

♦ *Note:* A 1hour30 incubation time for the first antibody can be use instead of an overnight incubation, but the overnight incubation gave slightly better results.

## 6. Mounting and observation

### Pollen in/on agarose

- Place a drop of citifluor-glycerine on a microscope slide.
- Place the cover slip with agarose facing down on the drop and slide it off.
- Cover the agarose with a rectangular cover slip and squeeze.
- Seal the edges with nail polish. Let dry.
- Observe the sample in the Nikon TE2000 with fluorescent light and fitted with the appropriate filter.

### Filter method

- Place a drop of citifluor-glycerine on a microscope slide.
- Remove the nylon filter from the tube and soak it upside down in the citifluor drop until all the pollen tubes are in the the citifluor.
- Cover with a rectangular cover slip
- Seal edges with nail polish, let dry.
- Observe the sample in the Nikon TE2000 with fluorescent light and fitted with the appropriate filter.

### Centrifugation method

- Discard supernatant.
- Resuspend pollen in the smallest possible amount of n-propyl-gallate.
- Mount on a microscope slide, cover with rectangular cover slip
- Seal edges with nail polish, let dry.
- Observe the sample in the Nikon TE2000 with fluorescent light and fitted with the appropriate filter.

## **Annexe 2 : Guide pour le marquage des filaments d'actine**

---

Protocoles de marquage de l'actine – labo Geitmann

---

### **Introduction à la fixation de l'actine chez les tubes polliniques**

Le marquage des filaments d'actine a été longuement discuté au travers de nombreux articles et les protocoles varient avec les groupes de recherche. Si il est fréquent d'observer de bons résultats chez des cellules telles que les fibroblastes, les résultats sont nettement différents lorsqu'il s'agit de cellules avec paroi cellulaire et à croissance rapide telles que les tubes polliniques. Il est ressortit de tous les essais effectués, que la rapidité de croissance est le point critique du marquage de l'actine. Il est apparu que la **qualité et la rapidité de la fixation** allait être le **facteur décisif**. Comment figer le tube et son cytosquelette d'actine dans une organisation la plus proche possible de la réalité? S'il semble évident que le tube doit arrêter sa croissance le plus rapidement possible afin que la phase de ralentissement introduise le moins possible d'artefacts, l'utilisation d'un fixatif trop puissant ou de cross-linkers peut, elle aussi, nuire à l'organisation de l'actine.

Parmi les méthodes de fixation, la cryofixation s'est avérée plus efficace que la fixation chimique, du fait de sa capacité à figer très rapidement le tube. Cependant, des travaux récents chez le lys ont utilisé des méthodes de fixation chimique permettant d'obtenir des résultats sensiblement équivalents (Lovy-Wheeler et al., 2005).

Si nous ne sommes pas parvenu à obtenir de tels résultats chez *Papaver rhoeas*, l'essai de plusieurs protocoles nous a permis d'obtenir des résultats différents de ceux initialement obtenu avec le protocole jusqu'ici utilisé (Mathieu Thomas) et nous a ainsi permis de discuter la structure de l'actine et l'effet des différents fixatifs sur l'organisation de l'actine. **Il est important de noter qu'aucune des méthodes de fixation n'est parfaite et que chacune d'entre elles introduit son lot d'artéfacts. Il est donc utile d'observer les résultats obtenus avec chacune de ces méthodes pour déterminer ce qui est un artéfact et ce qui ne l'est pas.**

Les facteurs variant parmi les trois protocoles sont : La concentration et le temps d'utilisation de MBS-ester, les temps d'incubations, les concentrations de formaldéhyde et de glutaraldéhyde.

Le protocole 1 (Mathieu Thomas) semble long et fastidieux sans raisons vraiment valables. Il ne semble pas nécessaire de séparer la fixation en trois étapes, ni de mettre le triton X 100 ultérieurement. Le temps d'incubation de la rhodamine paraît trop court. La concentration de MBS-ester est trop importante.

Le protocole 2 peut-être utilisé avec ou sans préfixation au MBS-ester:

-**Sans préfixation** : Marquage faible

-**Préfixation avec MBS-ester 10 $\mu$ M** : marquage fort, **fringe** d'actine à l'apex, fringe éloigné de l'apex (artéfact?), structure conique après le fringe (artéfact?), actin bundles in distal part (artéfact?).

-**Préfixation avec MBS-ester 100 $\mu$ M** : marquage un peu plus faible, **mesh** à l'apex (artéfact?), pas de structure conique après le mesh, actin bundles in distal part (artéfact).

Le protocole 3 repose sur l'utilisation d'une forte concentration de glutaraldéhyde (jusqu'à 1%). 0.5% a donné de bons résultats. Dans ce protocole aucun cross-linker (sulfo-EGS, MBS ester) n'est utilisé ce qui supprime le risque d'artéfacts induits par ceux-ci.

Cependant la forte intensité de la fixation aux aldéhydes pourrait elle aussi introduire des artefacts.

## **Actin labeling - Protocol 1 - Mathieu Thomas**

---

The following are the final concentrations. It is a good idea to prepare a 5x concentrated stock solution and keep it in 1 ml aliquots at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

- 75 mM KCl
- 1 mM  $\text{CaCl}_2$
- 1 mM  $\text{MgCl}_2$
- 100 mM PIPES-KOH, pH 6.8

### **Phalloidin-label after MBS fixation - optimized for *Papaver* (Mathieu Thomas)**

Germinate pollen on 0.5% or 1% agarose in medium covered with liquid medium. Prepare the fixation solutions not more than 1 hour before you intend to use them (MBS-ester solution should be kept in the dark until use). For the individual steps suck off as much of the liquid as possible with a tissue paper before your add one or few drops of the next solution.

Check whether the pollen has germinated before fixing it!

- 200  $\mu\text{M}$  MBS-ester in medium, 5 min
- fixation A: 2% formaldehyde, 0.05% glutaraldehyde, in medium; 30 min
- fixation B: 4% formaldehyde, 0.1% glutaraldehyde, in ASB; 30 min
- ASB, 5 min, repeat three times
- 0.1% Triton X-100 in ASB, 30 min
- ASB, 5 min
- rhodamine-phalloidin diluted 1:50, 0.05% BSA, in ASB, 15 min in the dark
- ASB, 5 min in the dark, repeat four times

Suck off liquid from the samples and mount in Citifluor-glycerin (or without).

## Actin labelling - protocol 2

---

### 1. Solutions

#### **Buffer 1**

The following solution can be stored at +4°C for a while.

- Pipes (100mM) ; MgSO<sub>4</sub> (5mM) ; CaCl<sub>2</sub> (0.5mM)
- pH9

#### **Buffer 2**

The following solution can be stored at +4°C for a while.

- Pipes (100mM) ; MgSO<sub>4</sub> (5mM) ; CaCl<sub>2</sub> (0.5mM) ; EGTA (10mM)
- pH7

#### **Pollen growth medium (GM) after Brewbaker and Kwack (BK)**

This medium works well for most pollen, except for lily.

*Final composition:* 100 µg mL<sup>-1</sup> H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 300 µg mL<sup>-1</sup> Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 100 µg mL<sup>-1</sup> KNO<sub>3</sub>, 200 µg mL<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>, 50 µg mL<sup>-1</sup> sucrose

Prepare a 10x concentrated stock solution without sucrose. To prepare 50 ml stock solution, weigh:

- 50 mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>
- 150 mg Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O
- 50 mg KNO<sub>3</sub>
- 100 mg MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O

and fill up to 50 ml with ddH<sub>2</sub>O. Solving all the crystals can take a while.

Freeze this stock solution in 1ml aliquots (Eppendorf tubes, labelled "10xBK", placed in plastic bag labeled with your name).

When you need the solution, thaw a 1ml aliquot and transfer it to a 10 ml cylinder, add

- 500 mg sucrose

and fill up to 10 ml with ddH<sub>2</sub>O.

### 2. Pollen hydration

- Take out one or several pollen samples from the freezer. Note the number code of the samples!

- Transfer the appropriate amount of pollen into one corner of a small Petri dish. If the pollen is one large lump, spread it a little bit with the spatula to increase the surface.
- Put the remaining pollen sample back in the freezer in a plastic bag or container marked with your name.
- Wet a piece of towelpaper with warm water and place it in the other corner of the Petri-dish.
- Close the lid and put something a little bit heavy on top to avoid drying out.
- Hydrate this way for 30 min.

### 3. Pollen germination

There are different ways of letting pollen germinate for immunolabel. Three of them are given here:

#### Germination on agarose

- Prepare liquid growth medium (GM) from your stock solution by diluting with ddH<sub>2</sub>O and adding the appropriate amount of sucrose.
- Using your liquid GM, prepare 1ml of 0.5% or 1% agarose GM. Weigh the appropriate amount of low melting agarose, put in an Eppendorf and add 1ml of liquid GM. Place the Eppendorf with the lid open in a small beaker containing some water. Heat several times for few seconds in the microwave oven and shake in between (with the lid closed). Repeat until no agarose grains are visible.
- Prepare a microscope slide with a series of small, round cover slips.
- Place drops of hot agarose GM on round cover slips.
- With a brush pick up some pollen and by knocking the handle against the table, spread pollen on the surface of the agarose.
- Place slide with cover slips in a Petri dish, add a towel wetted with hot water
- Close Petri dish, let incubate for 30 min.
- Add a drop of liquid GM on top of the agarose.
- Incubate until pollen germination is well underway.
- Add MBS-ester for pre-fixation on growth medium. See point 5.

#### Germination in agarose

Same procedure as above, but instead of growing on the agarose, the pollen is mixed with the agarose. Care has to be taken not to shock the pollen with agarose that is too hot, so temperature needs to be controlled!

- Proceed as above for the preparation of the agarose GM
- Place the Eppendorf with the agarose GM in the Eppendorf-waterbath and let cool to 42°C.
- With a plastic pipette, transfer an appropriate amount of agarose GM to a different Eppendorf that had been kept at the same temperature.
- Add pollen to the Eppendorf, vortex for one or two seconds, and use a large plastic pipette to transfer the pollen containing agarose GM to the round cover slips (see above).

- Place slide with cover slips in a Petri dish and proceed as above.
- Check germination after 60, 90, ... min.
- Add MBS-ester for pre-fixation in growth medium. **See point 5.**

### **Germination in liquid medium**

- Pollen is added to liquid GM placed in a small Erlenmeyer. It is important that the surface of the liquid is big - 4ml medium in a 25 ml Erlenmeyer is a possible combination for example.
- Place the Erlenmeyer in the incubator at 25°C for germination.
- Check germination by transferring a drop of pollen containing medium on a microscope slide.
- Add MBS-ester for pre-fixation in growth medium. **See point 5.**

◆ *Note:* It seems important to remove all the previous solution before doing a new treatment especially before adding the digestive / fixative solution (i.e. remove all growth medium). **Thus the filter method is probably the best one.**

## **4. Methods**

Depending on the way of pollen has been cultured, the solutions are added in the following way:

### **Pollen in/on agarose:**

- Once pre-fixation time is over place big drops of the treatment solution in a Petri dish covered with parafilm
- Place wet paper along the wall to keep the atmosphere humid.
- The cover slips are placed with the agarose facing down onto the drops of the solution.
- Cover the Petri dish and let incubate.
- Suck off all liquid and place the cover slip (agarose facing down) onto the drops of the next solution.

### **Pollen in liquid medium - filter method:**

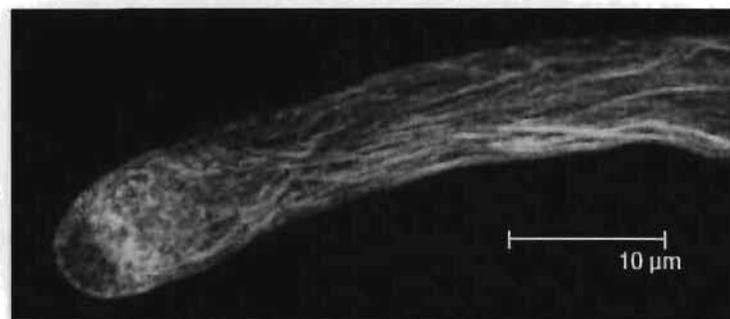
- Prepare small filters: Cut ca. 1cm long cylindrical pieces from blue or yellow pipette tips or 2-3 cm sections of transfer pipets (Fisher 13-711-7). Heat one end on a flame to melt slightly. Press that end on a nylon membrane. Let cool. Cut the membrane.
- Place the filters in the slots of an Eliza rack.
- Once pre-fixation time is over. Transfer pollen containing liquid GM into filter.
- Let liquid flow out by pressing the filter on ply wipers and replace immediately by the first solution.
- Let incubate
- Let liquid flow out by pressing the filter on ply wipers and replace immediately by the next solution.

**Pollen in liquid medium - centrifugation method:**

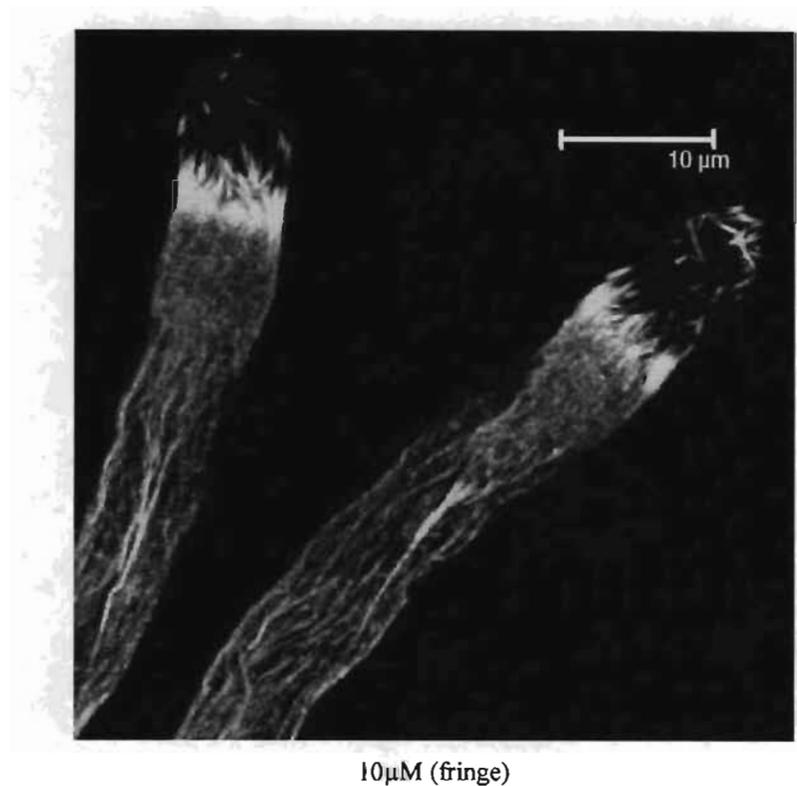
- Once pre-fixation time is over. Transfer pollen containing liquid GM with a big plastic pipette to Eppendorf caps.
- Centrifuge at highest RPM for 30 to 60 seconds
- Check whether the pollen has sedimented, if not, centrifuge again.
- Discard supernatant using a pipette.
- Add the first solution and resuspend pollen carefully by sucking into the big plastic pipette.
- Let incubate.
- Discard supernatant using a pipette.
- Add the next solution in the same way.

**5. Treatments**

**Pre-fixation:** A  $10\mu\text{M}$  to  $100\mu\text{M}$  MBS-ester treatment added in growth medium can be used 5 to 20 minutes before fixation to stabilize actin filaments. This treatment preserves actin filaments and provides a bright labelling. However it induces crosslinker-related artefacts such as dense actin bundles, a funnel-shaped sub-apical structure of actin and a long distance between the pollen tube apex and the actin cytoskeleton end. Moreover various concentrations of MBS-ester induce various organizations of the sub-apical part of actin cytoskeleton (from meshwork ( $100\mu\text{M}$ ) to cortical fringe ( $10\mu\text{M}$ )).  **$10\mu\text{M}$  for 10 or 15 minutes gave the best results.**



100  $\mu\text{M}$  (meshwork)



- **1.** Triton X-100 (0.05%) + Formaldehyde (3%) + Glutaraldehyde (0.5%) in buffer 1.  
*20 minutes*
- **2.** Buffer 1  
*5 minutes, 4 times*
- **3.** Buffer 2 + Rhodamine-phalloidin (*Molecular Probes*) (25 to 30 μL / mL)  
*1 hour to overnight (+4°C), in the dark*
- **4.** Buffer 2  
*5 minutes, 6 to 8 times*

## 6. Mounting and observation

### Pollen in/on agarose

- Place a drop of citifluor-glycerine on a microscope slide.
- Place the cover slip with agarose facing down on the drop and slide it off.
- Cover the agarose with a rectangular cover slip and squeeze.

- Seal the edges with nail polish. Let dry.
- Observe the sample in the Nikon TE2000 with fluorescent light and fitted with the appropriate filter.

**Filter method**

- Place a drop of citifluor-glycerine on a microscope slide.
- Remove the nylon filter from the tube and soak it upside down in the citifluor drop until all the pollen tubes are in the the citifluor.
- Cover with a rectangular cover slip
- Seal edges with nail polish, let dry.
- Observe the sample in the Nikon TE2000 with fluorescent light and fitted with the appropriate filter.

**Centrifugation method**

- Discard supernatant.
- Resuspend pollen in the smallest possible amount of n-propyl-gallate.
- Mount on a microscope slide, cover with rectangular cover slip
- Seal edges with nail polish, let dry.
- Observe the sample in the Nikon TE2000 with fluorescent light and fitted with the appropriate filter.

## Actin labelling – protocol 3

---

This protocol uses a high concentration of glutaraldehyde (0.5% to 1%) and no crosslinkers (MBS-ester; sulfo-EGS). It may induce artefacts but these are different than the ones induced by the protocol using 0.05% glutaraldehyde and MBS-ester or sulfo-EGS. Thus, using the two protocols may define what are the structures caused by MBS-ester related artefacts or by aldehyde related artefacts.

### 1 – 4. Follow steps used for protocol 2

#### 5. Treatments

- 1. triton X-100 (0.25%) + Formaldehyde (3%) + Glutaraldehyde (1%) in buffer\_1.  
*15 minutes*
- 2. Buffer 1  
*5 minutes*
- 3. Sodium borohydride (1mg/mL) freshly prepared still effervescent  
*5 minutes, 4 times*
- 4. Buffer 1  
*5 minutes, 4 times*
- 5. Buffer 2 + Rhodamine-phalloidin (*Molecular Probes*) (20 to 30  $\mu\text{L}$  / mL)  
*30 minutes to 2 hours, in the dark at +4C*
- 6. Buffer 2  
*5 minutes, 6 to 8 times*

◆ *Note: Sodium borohydride treatment can be omitted but it helps decreasing autofluorescence.*

### 6. Mounting and observation

#### Pollen in/on agarose

- Place a drop of citifluor-glycerine on a microscope slide.
- Place the cover slip with agarose facing down on the drop and slide it off.
- Cover the agarose with a rectangular cover slip and squeeze.
- Seal the edges with nail polish. Let dry.
- Observe the sample in the Nikon TE2000 with fluorescent light and fitted with the appropriate filter.

**Filter method**

- Place a drop of citifluor-glycerine on a microscope slide.
- Remove the nylon filter from the tube and soak it upside down in the citifluor drop until all the pollen tubes are in the the citifluor.
- Cover with a rectangular cover slip
- Seal edges with nail polish, let dry.
- Observe the sample in the Nikon TE2000 with fluorescent light and fitted with the appropriate filter.

**Centrifugation method**

- Discard supernatant.
- Resuspend pollen in the smallest possible amount of n-propyl-gallate.
- Mount on a microscope slide, cover with rectangular cover slip
- Seal edges with nail polish, let dry.
- Observe the sample in the Nikon TE2000 with fluorescent light and fitted with the appropriate filter.

### Annexe 3 : Collection de pollen

Espèce	Germination dans le milieu BK	Type de style	Numéro
<i>Datura</i>	Non	-	1
<i>Ibiscus</i>	Non	C	2
<i>Jasminum nudiflorum</i>	Oui	-	3
<i>Saint-paulia rupicola</i>	Oui	-	4
<i>Scillia peruviana</i>	Oui	-	5
<i>Lachenalia romelia</i>	Oui (fort taux de germination)	-	6
Tulipe	Oui	C	7 et 14
<i>Begonia</i>	-	P	8
<i>Hortensia</i>	Oui	-	9
Taro imperial	Non	-	10
<i>Narcissus anteriantus</i>	Oui (à partir de 1hr30 de germination)	C	11
<i>Trillium grandiflorum</i>	Oui (overnight)	P	12
rhododendron	Oui (overnight)	C	13
<i>Malus</i> « flowering crapapple »	-	C	16
<i>Pulsatilla vulgaris</i> « papageno »	-	-	17
<i>Magnolia</i> « Ann »	-	-	18
<i>Magnolia</i> « Betty »	-	-	19
<i>Aster novae - Angliae</i>	-	P	20
<i>Clematis alpina</i> « blue dancer »	-	-	21
<i>Cosmos bipinnatus</i>	-	-	22
<i>Tagetes patula</i> « œillet d'inde »	-	-	23
<i>Paeonia</i> « pivoine »	Oui (à partir de 1hr30 de germination)	C	24
<i>Penstemon palmeri</i>	Oui (à partir de 1hr30 de germination)	-	25

C=creux ; P=plein ; - = pas de donnée ; la colonne « numéro » indique le numéro inscrit sur l'appendice contenant le pollen de l'espèce en question dans la collection.