

SCIENCES POUR L'ENVIRONNEMENT

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

FACULTE DES SCIENCES

Département de Biologie et Physiologie Végétales

Thèse en cotutelle

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DES UNIVERSITÉS DE LIMOGES ET DE YAOUNDE I

Discipline: Biosciences de l'environnement et de la santé

Et Biotechnologie Végétale

Présentée et soutenue par

Marietta Solange SOUPI NKEUTCHA

Le 12 juin 2013

**IMPLICATION DES ARABINO GALACTANES PROTEINES DANS LE
DEVELOPPEMENT DES EMBRYONS CHEZ *Theobroma cacao* L.**

Rapporteurs :

Mr Jean Claude MOLLET, Professeur, Université de Rouen

Mr Stanley LUTTS, Professeur, Université de Louvain La Neuve

Examineurs :

Mr Guy COSTA, Maître de Conférences-HDR, Université de Limoges

Mr Denis OMOKOLO NDOUMOU, Professeur, Université de Yaoundé I

Mr Vincent GLOAGUEN, Professeur, Université de Limoges

DEDICACE

Gloire soit rendue à Dieu pour ce travail.

Je le dédie

A maman Ntumsi Fangwa dim Anastasie,

A maman Marie Bettone,

A mon fils Patrick Pince

REMERCIEMENTS

Le travail qui m'a conduit à la soutenance de cette thèse a été initié à l'Université de Yaoundé I et a pu être poursuivi à l'Université de Limoges, avec le soutien de la bourse «For Women in Science», attribuée par l'UNESCO-l'OREAL.

Je remercie tout d'abord le Professeur Denis OMOKOLO NDOUMOU pour m'avoir acceptée au sein du Laboratoire de Physiologie Végétale de l'ENS du Cameroun et soutenue dans ce projet et le Professeur Nicolas NIEMENAK pour m'avoir orientée dans le choix du sujet.

Je présente mes remerciements respectueux aux directeurs successifs du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, les Professeurs Pierre KRAUZ et Vincent SOL, pour m'avoir accueillie au sein de ce laboratoire. Je tiens à remercier particulièrement le professeur Vincent SOL pour son soutien.

Que les Professeurs Stanley LUTTS et Jean Claude MOLLET trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude pour avoir accepté d'établir un rapport de thèse malgré leurs nombreuses obligations. Je remercie vivement le Professeur Vincent GLOAGEN pour avoir accepté de présider le jury et mes co-directeurs, Denis OMOKOLO et Guy COSTA, pour leur aide scientifique et leur participation au jury. Plus particulièrement, je veux dire ma reconnaissance au Docteur Guy COSTA qui m'a fait découvrir des techniques biochimiques et qui a contribué à la rédaction et à la présentation de mon manuscrit.

Ma gratitude s'adresse aussi au Docteur Sabine LHERNOULD, qui a bien voulu co-encadrer mon travail, pour son aide au cours des expériences, et dans la rédaction du travail. Je veux aussi dire merci à sa famille, Julie, Léa et Julien, pour les moments très agréables passés avec eux dès mon arrivée en France. Ma reconnaissance va aussi vers le Professeur Pierre François DJOCGOUE, co-encadrant de ce travail au Cameroun pour son aide et ses conseils.

J'ai le plaisir de remercier toute l'équipe du LCSN pour les collaborations, les critiques constructives, le soutien et l'amitié, en particulier, le Professeur Rachida ZERROUKI qui nous a aidé à la synthèse du réactif de Yariv. Merci à tous ceux qui m'ont prêté une oreille attentive et ont su me reconforter pendant les moments difficiles. Je veux citer le Docteur Catherine RIOU, Mme Sylvie LAVAL, ..., Monsieur Frédéric AUTHIER le gentil..., qui a dépensé son temps et son carburant pour m'éviter de marcher dans le froid ou de m'exposer au danger de la nuit, et tous les Doctorants pour tous les moments d'échange et de partage.

Je suis redevable au Professeur Michel BAUDU et à toute l'équipe du Groupe de Recherche Eau, Sol et Environnement (GRESE), qui m'a souvent comptée parmi les siens à de nombreuses occasions. J'adresse mes remerciements chaleureux au Professeur Gilles GUIBAUD et aux Docteurs Stéphane SIMON et Isabelle BOURVEN pour leur aide précieuse, notamment leur formation à l'esprit scientifique et leur encadrement pendant la réalisation de mes travaux.

Ma sincère reconnaissance est adressée à monsieur le Directeur de l'école Doctorale, le Professeur Hubert BRIL, pour sa bienveillante sollicitude pour le bon déroulement de cette thèse.

Je ne saurais oublier l'équipe du Laboratoire de Physiologie Végétale de l'ENS du Cameroun, notamment le Professeur FOSTO, le Docteur M. BOUDJEKO, tous les Docteurs et tous les étudiants que j'ai côtoyés pendant mes travaux. Une pensée particulière est adressée à Alexandre NOAH, Théodore TAOGA et Romuald SOUGA, qui ont pris plusieurs fois en charge la préparation du matériel végétal pour me l'envoyer en France.

Concernant l'histo-cytologie je veux remercier la collaboration ponctuelle de la Faculté des Sciences et Techniques de Limoges, avec Mélanie MALHOUREUX, de la Faculté de Pharmacie de Limoges et de l'UFR Sciences, Université de Poitiers, avec les Docteurs Emile BERE et Pierrette FLEURAT-LESSARD.

Kasia , Rihab et Idelette, les «Snoupies», vous avez été plus proches de moi que tous, nous avons formé une famille, et j'ai passé des moments fabuleux en votre compagnie car vous avez su m'encourager et me faire garder le sourire, je vous souhaite tout le bonheur possible. Je m'en vais certes mais je reste proche de vous.

Merci à Isabelle, tu as tout partagé avec moi, ta famille, ta maison, ton temps, ton café, ton sérieux, Cajoline... Les mots ne suffiraient pas pour te dire merci. Malheureusement il n'y a que les mots qui puissent être inscrits ici. Mille mercis à toi et à ceux que j'ai connus à travers toi. Merci à Cajoline qui m'a assistée pendant la rédaction de cette thèse et qui a su me reconforter. Merci cajojo... A Jean Luc, j'exprime ma profonde gratitude. Merci pour ton accueil, pour ta patience ta gentillesse et ton sérieux. Je suis consciente des efforts qui ont été les tiens, mais saches qu'ils ne sont pas vains et qu'avec toi j'ai beaucoup appris de la vie. J'ai appris des choses qu'une thèse ne saurait enseigner. Le seul regret c'est de n'avoir pas pu trouver du travail ...

Merci Gosia, ton soutien m'a été plus que nécessaire pour traverser mes difficultés successives. Tu m'as aidé jusqu'au bout. Mille mercis. Merci à mes amis: Germo, Kasia, Sonda, Nathalie, Maha, Thomas, Alex, Arlette, Julie, Astride², Christelle, Virginie, Sandrine, Laurence, Joseph, Hermann, Pierre, Emile, Oumar, Néhémie, Claude, Ousman, Ben, Simplicie, Godwin, Félicité... Je ne pourrais nommer tous ceux qui m'ont accompagnée, encouragée, et soutenue pendant ces années de thèse. Je vous en suis très reconnaissante.

Merci à toute ma famille pour votre amour, votre confiance et votre soutien. Vous m'avez encouragée jusqu'au bout. Merci Marius, tu es plus que mon petit frère, ton amour et ton attention sans faille m'ont accompagnée tout au long de cette thèse. Un grand merci à toi Abbé Patrick, ton ordinateur m'a permis de terminer la rédaction de cette thèse après le vol du mien. Tu m'as appris à rechercher l'excellence depuis le Brevet jusqu'au Doctorat, tu m'as soutenue jusqu'au bout. Que Dieu te comble pour tes bienfaits. Grand-mère je te dis Merci du fond du cœur pour ton amour (tu t'en es allée, mais je ne t'oublie pas). Merci à mes mamans, qui me sont chères, autant l'une que l'autre, pour votre amour inconditionnel et votre attention particulière à mon endroit. Mon amour pour vous est sans mesure.

Prince, mon bout de chou que j'ai abandonné pour les études, merci pour la patience envers ta maman et pour ton amour malgré la distance. Je t'aime mon chéri.

Merci à tous ceux avec qui j'ai partagé au moins un instant de bonheur et d'amitié, s'il n'y a pas assez de place sur ces pages pour inscrire vos noms sachez bien qu'ils sont inscrits dans mon cœur et que je ne vous ai pas oubliés.

SOMMAIRE

<i>Dédicace</i>	<i>I</i>
<i>Remerciements</i>	<i>II</i>
<i>Sommaire</i>	<i>V</i>
<i>Liste des figures</i>	<i>X</i>
<i>Liste des tableaux</i>	<i>XV</i>
<i>Liste des abréviations</i>	<i>XVI</i>
<i>Avant propos</i>	<i>1</i>
PARTIE A. Revue bibliographique	2
I. Le cacaoyer	4
I.1. Origine	4
I.2. Taxonomie et diversité	4
I.2.1. Taxonomie	4
I.2.2. Diversité génétique	5
I.3. Biologie du cacaoyer	5
I.4. Ecophysiologie et Culture	7
I.5. Importance du cacao	8
I.5.1. Importance socioculturelle	8
I.5.2. Importance économique	8
I.6. Maladies et ravageurs du cacaoyer	9
I.6.1. Maladies	9
I.6.2. Ravageurs	10
I.7. Techniques de sélection de cacaoyers à haute valeur agronomique	11
I.7.1. Identification du matériel génétique	11
I.7.2. Création d'hybrides	11
I.7.3. Sélection assistée par les marqueurs moléculaires	12
I.8. Techniques de multiplication des cacaoyers	12
I.8.1. Multiplication végétative traditionnelle	12
I.8.2. Culture <i>in vitro</i> du cacaoyer	12
II. Embryogénèse	14
II.1. Organisation générale du développement embryonnaire	14
II.2. Stades de développement des embryons	14

II.3.	Particularités de l'embryogenèse zygotique	16
II.3.1.	Premières étapes du développement du zygote	16
II.3.2.	Dessiccation et dormance des graines	16
II.4.	Particularités de l'embryogenèse somatique	16
II.4.1.	Origine de l'embryon somatique	17
II.4.2.	Facteurs impliqués dans l'embryogenèse somatique	17
II.1.	Rôle de la paroi dans le développement des embryons	18
III.	Organisation de la paroi des cellules végétales chez les dicotyledones	19
III.1.	Description de la paroi	19
III.2.	Composition moléculaire de la paroi primaire	20
III.2.1.	Polysaccharides	20
III.2.1.1.	Cellulose	20
III.2.1.2.	Hémicelluloses	21
III.2.1.3.	Pectines	21
III.2.2.	Protéines	22
III.2.2.1.	Enzymes	23
III.2.2.2.	Protéines structurales	23
IV.	Les arabinogalactanes protéines	25
IV.1.	Structure des AGPs	25
IV.1.1.	Structure de la partie protéique	26
IV.1.2.	Structure de la partie glucidique	27
IV.2.	Maturation des AGPs	29
IV.2.1.	L'hydroxylation de la proline	29
IV.2.2.	La glycosylation	30
IV.2.3.	L'ancrage GPI	30
IV.3.	Analyse et caractérisation des AGPs	30
IV.3.1.	Sondes d'analyse	31
IV.3.2.	Techniques d'analyses	31
IV.4.	Lieu d'expression	32
IV.5.	Mode d'action	32
IV.6.	Importance socio économique des AGPs	34
IV.7.	Fonction biologique des AGPs	34
IV.8.	Implication des AGPs au cours de l'embryogenèse	35
V.	Problematique	36
VI.	Objectifs	37
PARTIE B.	Materiel et methodes	38
I.	Matériel biologique	40
II.	Conditions de prélèvement et de culture	41

II.1.	Obtention des embryons zygotiques et de l'albumen	41
II.2.	Production des embryons somatiques	41
II.2.1.	Embryons somatiques primaires	41
II.2.2.	Embryons somatiques secondaires sur milieu solide	42
II.2.3.	Embryons somatiques secondaires sur milieu liquide	42
III.	Synthese du β -d-glucosyl yariv	43
IV.	Extraction et purification des AGPs	44
IV.1.	Extraction des protéines	44
IV.2.	Extraction et purification des AGPs	44
V.	Analyses histologiques	45
V.1.	Protocoles de Fixation-Inclusion	45
V.1.1.	Fixation-Inclusion dans le LRW (London Resin White)	45
V.1.2.	Fixation-inclusion dans la paraffine	45
V.2.	Obtention des sections semi-fines et ultra-fines des échantillons	46
V.2.1.	Section du matériel inclus en LRWhite	46
V.2.2.	Section du matériel inclus en Paraffine	46
V.3.	Double coloration des glucides et des protéines au PAS-Naphtol	46
V.3.1.	Principe de la double coloration PAS-Naphtol	46
V.3.2.	Coloration PAS-Naphtol	47
V.4.	Observation microscopique de fluorescence	47
V.5.	Microscopie électronique à transmission (MET)	47
VI.	Dosages biochimiques	48
VI.1.	Dosage des protéines solubles	48
VI.1.1.	Principe	48
VI.1.2.	Dosage colorimétrique	48
VI.2.	Dosage des AGPs par immuno-électrophorèse	48
VI.2.1.	Principe	48
VI.2.2.	Electrophorèse en fusée	49
VII.	Analyses chromatographiques	49
VII.1.	Chromatographie d'exclusion Séphadex G25	49
VII.2.	Chromatographie liquide à haute performance en phase inverse	49
VII.3.	Chromatographie d'exclusion stérique à haute performance	50
VII.4.	Chromatographie Liquide-Gaz	51
VIII.	Analyses electrophoretiques	52
VIII.1.	Electrophorèse unidimensionnelle sur gel de polyacrylamide	52
VIII.1.1.	Principe	52
VIII.1.2.	Préparation des échantillons	52
VIII.1.3.	Séparation	53

VIII.2.	Coloration des protéines à l'argent	53
VIII.3.	Coloration des protéines et des AGPs au bleu de Coomassie couplé au Yariv	53
VIII.3.1.	Principe	53
VIII.3.2.	Coloration	53
VIII.4.	Coloration des protéoglycanes au bleu alcian	54
VIII.4.1.	Principe	54
VIII.4.2.	Protocole de coloration	54
VIII.5.	Coloration des glycoprotéines à l'acide périodique de Schiff (PAS)	54
VIII.5.1.	Principe de coloration au réactif de Schiff	54
VIII.5.2.	Protocole de coloration	55
IX.	Analyses immunologiques	55
IX.1.	Western blot	55
IX.2.	Dot blot	55
IX.3.	Immuno marquage des AGPs sur membrane	56
IX.4.	Immunomarquage des AGPs par or-colloïdal et par fluorescence	56
X.	Analyses spectro -fluorimétriques	57
X.1.	Principe	57
X.2.	Matrice d'excitation-émission fluorescence en 3 dimensions (3D)	58
PARTIE C.	Résultats	60
I.	Caractérisation morphologique, histologique et biochimique des stades de développement des embryons	62
I.1.	Caractérisation morphologique des embryons de cacaoyer	63
I.1.1.	Obtention et caractérisation morphologique des embryons zygotiques	64
I.1.2.	Production et caractérisation des embryons somatiques	65
I.1.2.1.	Les embryons somatiques primaires	65
I.1.2.2.	Les embryons somatiques secondaires	67
I.2.	Caractérisation histologique des embryons zygotiques et somatiques de cacaoyer	70
I.2.1.	Les embryons zygotiques	70
I.2.2.	Les cals embryogène et non embryogène	71
I.2.3.	Les embryons somatiques	72
I.3.	Caractérisation biochimique des embryons zygotiques et somatiques de cacaoyer	74
I.3.1.	Mise au point du protocole d'extraction des protéines	74
I.3.2.	Analyse du protéome des embryons zygotiques et de l'albumen du cacaoyer génotypes Sca 6, SNK 630, et ICS 60.	77
II.	Evolution du protéome et du glycoprotéome au cours de l'embryogenèse zygotique et somatique chez le cacaoyer, SNK 630	80
II.1.	Etude du protéome des embryons du clone SNK 630	81
II.2.	Analyse du glycoprotéome des embryons du clone SNK.630	83
II.3.	Analyse de la fraction protéoglycanique dans les embryons du clone SNK 630	85

III. Identification, purification et caractérisation des d'AGPs au cours de l'embryogenèse zygotique et somatique chez le cacaoyer, SNK 630	88
III.1. Synthèse du β -D-glucosyl Yariv	88
III.2. Détection des AGPs dans les embryons du clone SNK 630	91
III.3. Quantification des AGPs dans l'albumen et les embryons du génotype SNK.630	92
III.4. Purification des AGPs du milieu de culture et des embryons du génotype SNK 630	94
III.4.1. Séparation des AGPs sur la base de leur propriété hydrophobe	95
III.4.2. Caractérisation biochimique des fractions chromatographiées	97
III.4.3. Séparation des AGPs sur la base de leur masse moléculaire	99
III.4.3.1. Détermination des masses moléculaires des AGPs de la gomme arabique après chromatographie d'exclusion stérique	99
III.4.3.2. Détermination des masses moléculaires des AGPs purifiées à partir du génotype SNK 630 de cacaoyer	102
III.4.3.3. Comparaison des profils chromatographiques des AGPs de cacaoyer séparées apr CES couplée détection UV à 215 nm et 280 nm	103
III.4.3.4. La fluorescence des AGPs	104
III.4.3.5. Comparaison des empreintes des AGPs de la gomme arabique obtenues par détection UV et fluorescence couplée à la CES	106
III.4.3.6. Association de la détection UV/fluorescence des protéines couplée à la chromatographie d'exclusion stérique pour l'analyse des embryons somatiques du génotype SNK 630	108
IV. Évolution du pool d'agps de 2 stades successifs des embryons zygotiques et somatiques du cacaoyer et des milieux de culture	111
IV.1. Analyse des AGPs et/ou des AG peptides au stade VI et VII pour les embryons zygotiques	111
IV.2. Analyse des AGPs et/ou des AG peptides au stade VI et VII pour les embryons somatiques secondaires	114
IV.3. Analyse des AGPs et/ou des AG peptides au stade VI et VII dans les milieux de culture des embryons somatiques secondaires	117
PARTIE D. Discussion	120
I. Expression d' AGPs chez le cacaoyer	122
II. Importance de la caractérisation des agps d'embryons de cacaoyer	125
III. Diversité des AGPs des embryons de cacaoyer	128
IV. Fonction biologique des AGPs au cours du développement embryonnaire	129
Conclusions et perspectives	132
I. Conclusion	132
II. Perspectives	134
Références bibliographiques	138
Annexes	165

LISTE DES FIGURES

Figure A :	La production du chocolat passe par la transformation des fruits de cacaoyer A1 : De la cabosse (c) à la poudre de cacao (flèche) en passant par les fèves séchées(f); A2: De la poudre de cacao au chocolat en tablettes. _____	1
Figure B :	Production du cacao au Cameroun, obtenue jusqu'en 2012 et prévue jusqu'en 2015. _____	2
Figure 1 :	Répartition géographique de la culture du cacaoyer dans le monde  Criollos ;  Trinitarios;  Forasteros ;  Cupuaçu ;  Nacional _____	5
Figure 2 :	Représentation schématique du développement du système racinaire de cacaoyer obtenu à partir d'un embryon (A), d'une bouture (B). _____	6
Figure 3 :	Production mondiale des fèves de cacao par pays pour l'année 2010. _____	9
Figure 4 :	Différents stades de développement des embryons du pois chiche présentant la morphologie associée aux jours de culture. A – stade globulaire (15 - 22 J), B – stade cordiforme (22 - 32 J), C – stade torpille (32 - 42 J), D – stade cotylédonaire (38 - 48 J) (d'après Mishra et al., 2012). _____	15
Figure 5 :	Structure d'une paroi primaire. _____	20
Figure 6 :	Structure schématique des trois principaux polysaccharides de la paroi d'après (Palin et Geitmann, 2012). Kdo...Dha.... _____	22
Figure 7 :	Structure des arabinogalactane protéines. (Rumyantseva, 2005) _____	25
Figure 8 :	Structure schématique des différentes classes d'AGPs déglycosylées et natives chez <i>Arabidopsis thaliana</i> (Schultz et al., 2002 ;Schowalter et al., 2010) _____	26
Figure 9 :	Représentation schématique de la diversité de la structure glycanique des AGPs. (Ellis et al., 2010) A Le modèle Wattle blossom des AGPs avec une ancre GPI ; B Le modèle twisted hairyrope de l'AGP de la gomme arabique; C structure de polysaccharide de type AG; D Structure de l'AGP du Mélèze ; GPI glycosylphosphatidylinositol _____	28
Figure 10 :	Synthèse et maturation des AGPs (Ellis et al. 2010). ER.réticulum endoplasmique ; Golgi, appareil de Golgi _____	29
Figure 11 :	Modélisation du mécanisme d'action des AGPs (Showalter, 2001 ; Hijazi, 2011). _____	33
Figure 12 :	Fleurs et fruits du cacaoyer (<i>Theobroma cacao</i>) Boutons floraux (A). Fleur ouverte du génotype SNK 630 présentant les staminodes (s) et les pétales (p) (B). Cabosses et chérelles (cabosses juvéniles) du génotype ICS 60 (C). Trait = 1cm. _____	40
Figure 13 :	Description du récipient d'immersion temporaire automatique. Le RITA est constitué d'une cloche (A2) qui protège le milieu (M), d'un panier dans lequel sont déposés les cals et d'un couvercle (A1) ; sous la pression de l'air le milieu remonte dans le panier et les cals sont immergés (CI). _____	43
Figure 14 :	Embryons zygotiques à différents stades de développement (I, II, III, IV, V, VI, VII) prélevés dans des cabosses de maturité différentes du clone Sca 6 (A). Embryons renfermés dans le tissu nucellaire (I) stade globulaire, (II) stade cordiforme, (III) stade torpille; Embryons isolés IV-VII stades cotylédonaire; c, cotylédon; n, nucelle; r, radicule; trait = 1 mm. Les cabosses ont été collectées au Cameroun (cf matériel et méthodes). _____	65

- Figure 15 :** Développement des embryons primaire sur des cals. (A), cal blanchâtre non embryogène. (B) cal embryogène (astérisque) portant des embryons : (B1) chez le clone ICS 60, (B2), chez le clone Sca 6; trait = 1 mm. _____ 66
- Figure 16 :** Embryons somatiques primaires de *T. cacao* clone Sca 6 à différents stades de développement. (I), stade globulaire ; (II), stade cordiforme ; (III), stade torpille ; (IV-VII), stades cotylédonaire. C, cotylédon; r, radicule; trait = 1mm. _____ 67
- Figure 17 :** Processus d'embryogenèse somatique secondaire de *T. cacao* clone SNK 630. A, Cotylédons d'embryons primaires. B, Fragments de cotylédons. C, Cals portant des embryons, trait = 1 cm. __ 68
- Figure 18 :** Comparaison des biomasses embryogènes (g) produites par chacun des 3 génotypes (Sca 6, SNK 630, ICS 60) après 2 mois de culture en milieu solide et grâce au système d'immersion temporaire RITA. _____ 69
- Figure 19 :** Embryons somatiques secondaires à différents stades de développement, I-VII du génotype SNK 630. C, cotylédon; r, radicule; s, suspenseur; trait = 1 mm. _____ 69
- Figure 20 :** Caractérisation histologique des embryons zygotiques de cacaoyer aux stades cotylédonaire IV à VII. IV A, axe du stade IV; IV B cotylédon du stade IV ; V fragment de l'axe d'un embryon au stade V; VI, fragment d'un embryon au stade VI; VII A, axe d'un embryon au stade VII ; VII B, fragment de cotylédon d'un embryons au stade VII; apc, apex caulinaire ; apr, apex racinaire ; c, cotylédon; co cortex; m, tissu médullaire; v, tissu vasculaire; trait = 1 mm. _____ 71
- Figure 21 :** Mise en évidence de l'organisation tissulaire des cals embryogènes et non embryogènes. A-a, Cal embryogène coloré au PAS/Naphtol; B-b, cal non embryogène coloré au PAS/Naphtol ; A-B trait noir = 200µm, a-b trait blanc = 40µm. _____ 72
- Figure 22 :** Sections longitudinales d'embryons somatiques primaires aux stades I à V. I, stade globulaire ; II, stade cordiforme ; III, stade torpille ; IV et V, stades cotylédonaire. c, cotylédon; co cortex; m, tissu médullaire; v, tissu vasculaire; trait = 500 µm. _____ 73
- Figure 23 :** Sections longitudinales d'embryons somatiques secondaires aux stades I à V. I, stade globulaire ; II, stade cordiforme ; III, stade torpille ; IV et V, stades cotylédonaire. c, cotylédon; co cortex; m, tissu médullaire; v, tissu vasculaire trait = 500 µm. _____ 73
- Figure 24 :** Profil électrophorétique 1D SDS-PAGE de protéines extraites d'embryons zygotiques, du génotype SNK 630 au stade VII, sans cotylédons . (A), Extraction au TCA/acétone et précipitation à l'acétone; (B) Extraction au tampon HEPES puis précipitation à l'acétone ; (C), Extraction au tampon phosphate sans précipitation ; (D), Extraction au tampon HEPES sans précipitation. Les flèches montrent des bandes protéiques présentes dans l'extrait (D) et absentes dans les autres profils. ____ 76
- Figure 25 :** Profil 1D SDS-PAGE des protéines extraites des embryons zygotiques aux stades IV, V, VI, VII pour les trois génotypes de cacaoyer Sca 6; SNK 630; ICS 60. _____ 77
- Figure 26 :** Profil 1D SDS-PAGE des protéines extraites de l'albumen des embryons zygotiques aux stades III, IV, V, VI pour les trois génotypes de cacaoyer Sca 6; SNK 630; ICS 60. _____ 78
- Figure 27 :** Profil électrophorétique 1D SDS-PAGE d'extraits de protéines de *Theobroma cacao*, génotype SNK 630. Les protéines sont révélées par AgNO₃. (A), Albumen aux stades de développement embryonnaire III à VI ; (EZ), Embryons zygotiques des stades de développement embryonnaire IV à VII. Profil électrophorétique 1D SDS-PAGE sur gel à 8% d'extraits de protéines de *Theobroma*

- cacao*, génotype SNK 630. (ESI), Embryons somatiques primaires des stades de développement embryonnaire IV à VII ; (ESII), Embryons somatiques des stades de développement embryonnaire IV à VII. Flèches, protéines présentant une expression modifiée. _____ 81
- Figure 28 :** Profil électrophorétique 1D SDS-PAGE sur gel à 8% de glycoprotéines de *Theobroma cacao* génotype SNK 630. Les glycoprotéines ont été révélées par l'acide périodique/réactif de Schiff (PAS). (A), Albumen aux stades de développement embryonnaire III à VI ; (EZ), Embryons zygotiques des stades de développement embryonnaires IV à VII ; (ESI), Embryons somatiques primaires des stades de développement embryonnaires IV à VII ; (ESII), Embryons somatiques des stades de développement embryonnaire IV à VII. Flèches, protéines présentant une expression modifiée. ____ 84
- Figure 29 :** Profil électrophorétique 1D SDS-PAGE sur gel à 8% de protéoglycanes de *Theobroma cacao*, génotype SNK 630. Les protéoglycanes ont été révélées au bleu alcian pH 1. (A), Albumen aux stades de développement embryonnaires III à VI ; (EZ), Embryons zygotiques des stades de développement embryonnaires IV à VII ; (ESI), Embryons somatiques primaires des stades de développement embryonnaires IV à VII ; (ESII) Embryons somatiques des stades de développement embryonnaires IV à VII. Flèches, protéines présentant une expression modifiée. _____ 86
- Figure 30 :** Schéma de synthèse du β -D-glucosyl Yariv. _____ 89
- Figure 31 :** β -D-glucosyl Yariv, A structure, B, Spectre RMN. _____ 90
- Figure 32 :** Electrophorèse sur gel d'agarose contenant : (A), 15 μ M β -D-glucosyl Yariv commercial ; (B) 15 μ M de β -D-glucosyl Yariv préparé au laboratoire. Des concentrations croissantes (0,25-1 μ g) d'AGP de gomme arabique d'acacia ont été utilisées. _____ 90
- Figure 33 :** Profil électrophorétique 1D SDS-PAGE sur gel à gradient (4-15) de protéines et d'AGPs de *Theobroma cacao*, génotype SNK 630. Les protéines sont révélées par la double coloration bleu de coomassie/ β -D-glucosyl Yariv. (A), Albumen aux stades de développement embryonnaire III à VI ; (EZ) Embryons zygotiques des stades de développement embryonnaire IV à VII. Profil électrophorétique 1D SDS-PAGE sur gel à 8% d'extraits de protéines de *Theobroma cacao*, clone SNK 630. (ESI), Embryons somatiques primaires des stades de développement embryonnaire IV à VII ; (ESII) Embryons somatiques des stades de développement embryonnaire IV à VII. Flèches, protéines présentant une expression modifiée _____ 92
- Figure 34 :** Evolution de la teneur en β -D-glucosyl Yariv AGPs de *Theobroma cacao* L. dans l'albumen, les embryons zygotiques et somatiques pour les stades de développement III à VII. MF, Matière Fraîche. _____ 93
- Figure 35 :** Empreinte chromatographique en phase inverse avec détection à 215 nm d'AGPs de *Theobroma cacao* génotype SNK 630, précipitées par le β -D-glucosyl Yariv. (Rose), embryons zygotiques au stade VII ; (Bleu), embryons somatiques secondaires au stade VII ; (Noir), milieu de culture des embryons somatiques secondaires au stade VII. _____ 95
- Figure 36 :** Empreinte chromatographique en phase inverse avec détection à 280 nm d'AGPs de *Theobroma cacao* génotype SNK 630, précipitées par le β -D-glucosyl Yariv. (Bleu), embryons zygotiques au stade VII ; (Rose), embryons somatiques secondaires au stade VII ; (Noir), milieu de culture des embryons somatiques secondaires au stade VII. _____ 96

- Figure 37 :** Histogramme montrant le pourcentage molaire des monosaccharides identifiés dans la fraction B, obtenue après chromatographie en phase inverse d'un extrait de protéines précipitées par le β -D-glucosyl Yariv, chez *Theobroma cacao*, génotype SNK 630. Barre rose, Embryons zygotiques au stade VII ; Barre bleue, Embryons somatiques secondaires au stade VII ; Barre noire, Milieu de culture des embryons somatiques secondaires au stade VII. _____ 98
- Figure 38 :** Profils chromatographiques d'exclusion stérique (CES) de la gomme arabique d'Acacia(Sigma), détection à 215 nm (trait plein), et à 280 nm (trait pointillé). (A), Profil chromatographique obtenu à 215 nm ; (B), profil chromatographique obtenu à 215 et 280 nm. Flèche, pic différent entre 215 et 280 nm. _____ 100
- Figure 39 :** Profils chromatographiques d'exclusion stérique (CES) détectées à 215 nm d'extrait de protéines préalablement purifiées par le β -D-glucosyl Yariv chez *Theobroma cacao*, génotype SNK 630 au stade de développement VII. (Rose), embryons zygotiques ; (Bleu), embryons somatiques secondaires;(Noir) milieu de culture des embryons somatiques secondaires. _____ 102
- Figure 40 :** Profils chromatographiques d'exclusion stérique (CES), détectés à 280 nm, d'extrait de protéines préalablement purifiées par le β -D-glucosyl Yariv chez *Theobroma cacao*, génotype SNK 630 au stade de développement VII. (Noir), embryons zygotiques; (Bleu), embryons somatiques secondaires ; (Rose), milieu de culture des embryons somatiques secondaires. _____ 104
- Figure 41 :** Spectre de fluorescence 3D d'extrait de protéines dans un tampon phosphate 50 mM à pH $7 \pm 0,1$. (A), AGPs de gomme arabique d'Acacia ; (B), AGPs purifiées par β -D-glucosyl Yariv des embryons zygotiques de *Theobroma cacao*, génotype SNK 630 au stade de développement VII ; (C), AGPs purifiées par β -D-glucosyl Yariv des embryons somatiques secondaires de *Theobroma cacao*, génotype SNK 630 au stade de développement VII, (D), AGPs purifiées par β -D-glucosyl Yariv des feuilles de peuplier hybride clone 717 1B4. _____ 105
- Figure 42 :** Profils chromatographiques d'exclusion stérique (SEC) de la gomme arabique d'Acacia. (A), trait pointillé : spectre de fluorescence Ex/Em 221/350, trait pointillé gras : spectre UV 280 nm ; (B), trait pointillé : spectre de fluorescence Ex/Em 221/350, trait plein gras : spectre UV 215 nm. Flèche, épaulement du spectre de fluorescence Ex/Em 221/350 _____ 106
- Figure 43 :** Profils chromatographiques d'exclusion stérique (SEC) d'extrait de protéines d'embryons somatiques secondaires préalablement purifiées par le β -D-glucosyl Yariv chez *Theobroma cacao*, génotype SNK 630 au stade de développement VII. Trait plein, spectre UV 215 nm ; Trait pointillé, spectre de fluorescence Ex/Em 221/350 nm. _____ 108
- Figure 44 :** Profils chromatographiques d'exclusion stérique (CES) d'extrait de protéines d'embryons zygotiques de *Theobroma cacao* génotype ICS 60. Protéines préalablement purifiées par le β -D-glucosyl Yariv (A), stade embryonnaire VI; (B), stade embryonnaire VII. (Trait plein), spectre UV 215 nm ; (Trait pointillé), spectre de fluorescence Ex/Em 221/350 nm. _____ 113
- Figure 45 :** Profils chromatographiques d'exclusion stérique (CES) d'extrait de protéines d'embryons somatiques secondaires préalablement purifiées par le β -D-glucosyl Yariv de *Theobroma cacao* génotype SNK 630. (A), stade embryonnaire VI ; (B), stade embryonnaire VII. Trait plein, spectre UV 215 nm ; Trait pointillé, spectre de fluorescence Ex/Em 221/350 nm. _____ 115

- Figure 46 :** Profils chromatographiques d'exclusion stérique (CES) d'extrait de protéines d'embryons somatiques secondaires de *Theobroma cacao* génotype Sca 6. Protéines préalablement purifiées par le β -D-glucosyl Yariv (A), stade embryonnaire VI ; (B), stade embryonnaire VII. Trait plein, spectre UV 215 nm ; Trait pointillé, spectre de fluorescence Ex/Em 221/350 nm. _____ 116
- Figure 47 :** Profils chromatographiques d'exclusion stérique (CES) de sécrétions d'AGPs de *Theobroma cacao*, purifiées par le β -D-glucosyl Yariv. (A), albumen du génotype embryogène SNK 630 ; (B), milieu de culture génotype embryogènes, SNK 630 ; (C), milieu de culture génotype peu embryogènes (ICS 60). (Trait plein), spectre UV 215 nm ; (Trait pointillé), spectre de fluorescence Ex/Em 221/350 nm. _____ 118
- Figure 48 :** Coupes longitudinales d'un embryon somatique (A) montrant des sites de marquage par immunofluorescence FITC essentiellement dans la paroi (B), anticorps LM 14; C, Témoin avec fluorescence non spécifique. _____ 134
- Figure 49 :** Coupe ultra fine dans l'albumen d'un embryon zygotique du génotype SNK 630 au stade II. Inclusion dans la résine LRW et immunomarcué à l'or (billes de 10 nm) anticorps JIM 8. A cellules entières de l'albumen (Barre 2 μ m), B Vacuoleimmunomarcuée (Barre 1 μ m), C Témoin sans marquage (Barre 1 μ m), Det E, Cytoplasme et paroi immunomarcués (Barre 2 μ m). _____ 135
- Les analyses biochimiques seront poursuivies par la détection par infrarouge et spectroscopie de masse des groupements sulfatés dans les AGPs. _____ 135

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1 :** Quelques anticorps dirigés contre les AGPs. _____ 31
- Tableau 2 :** Anticorps anti AGPs, leur spécificité et leur dilution. _____ 56
- Tableau 3 :** Rapport des pourcentages molaires d'arabinose et de galactose de la fraction B, détectée après séparation par chromatographie en phase gazeuse d'extraits protéiques précipités par le β -D-glucosyl Yariv, chez *Theobroma cacao* génotype SNK 630 _____ 98
- Tableau 4 :** Masses moléculaires apparentes des différents pics séparés par chromatographie d'exclusion stérique et détection aux UV dans la gomme arabique d'Acacia (Sigma), comparées à celles de la littérature. _____ 101
- Tableau 5 :** Liste des masses moléculaires des pics de protéines, de *Theobroma cacao*, clone SNK 630, au stade de développement VII, préalablement précipitées avec le β -D-glucosyl Yariv puis séparées par chromatographie d'exclusion stérique à 215 nm. _____ 103
- Tableau 6 :** Résultats des tests biochimiques des pics collectés à la suite des chromatographies d'exclusion stérique des AGPs de la gomme arabique d'Acacia (Fig. 38, 42). Test de précipitation au β -D-glucosyl Yariv, test dot blot avec les anticorps (LM2 et JIM4), test à l'orcinol sulfurique. + présence, - absence. _____ 107
- Tableau 7 :** Comparaison des profils chromatographiques d'extraits de protéines issues d'embryons somatiques secondaires au stade VII précipitées au β -D-glucosyl Yariv (volume d'élution, masses moléculaires, nombre de pics) et détectées par fluorescence Ex/Em : 221/350 nm et aux UV à 215 nm (Fig. 46). 109
- Tableau 8 :** Résultats des tests biochimiques des pics collectés à la suite des chromatographies d'exclusion stérique d'extraits de protéines d'embryons somatiques secondaires de *Theobroma cacao* génotype SNK 630 au stade de développement VII (Fig. 46). Protéines préalablement purifiées par le β -D-glucosyl Yariv, test de précipitation au β -D-glucosyl Yariv, test dot blot avec les anticorps (LM2 et JIM4), test à l'orcinol sulfurique. + présence, - absence. _____ 110

LISTE DES ABREVIATIONS

AGPs	Arabinogalactanes protéines
Ala	Alanine
Ara	arabinose
CLHP	Chromatographie liquide à haute performance
EtNP	éthanolamine- phosphate
FITC	Fluorescein isothiocyanate
Gal	Galactose
GlcN	glucosamine
Gly	Glycine
GRPs	Glycoprotéines Riches en Glycine
HPRG	Glycoprotéines riches en hydroxyproline (Hydroxyprolin rich glycoproteins)
ICS	Imperial College Selection
Lys	Lysine
Man	Mannose
PAGE	Electrophorèse en gel de polyacrylamide
Pro	Proline
PRPs	Protéines Riches en Proline
Rha	Rhamnose
SAB	Sérum Albumine Bovine
Sca	Scavina
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
Ser	sérine
SNK	Sélection de NKOenvone
TBST	Tampon Tris-Base NaCl Tween 20
TDZ	Thidiazuron
TEMED	N,N,N,N,-tétraméthylènediamine Tris-(hydroxyméthol)-aminométhane
TFA	Acide trifluoroacétique
Thr	Thréonine
Tris	Tris-(hydroxyméthyl)
Tyr	Tyrosine

AVANT PROPOS

Le cacaoyer, essence des régions tropicales humides, est cultivé pour ses fèves commercialisées majoritairement pour la production de produits agroalimentaires, dont le cacao, produit de base, aboutit à l'élaboration du chocolat (Fig. A), produit pouvant atteindre un label de luxe. Les domaines pharmaceutiques et cosmétiques sont également de bons candidats pour l'utilisation de ces fèves.



Figure A : La production du chocolat passe par la transformation des fruits de cacaoyer A1 : De la cabosse (c) à la poudre de cacao (flèche) en passant par les fèves séchées(f); A2: De la poudre de cacao au chocolat en tablettes.

Pendant la campagne cacaoyère de 2011/2012, 4 millions de tonnes de fèves ont été produites dans le monde, dont 2,826 millions en l'Afrique, soit 71% de la production mondiale. La Côte d'Ivoire, premier producteur mondiale des fèves de cacao, est suivie, en Afrique, par le Ghana, le Nigéria et le Cameroun, qui occupe la 4^{ème} place. Au plan mondial, le Cameroun est en 5^{ème} position, et une importante hausse de production est prévue pour 2015 (Fig. B).

Le cacao est une culture de rente pour l'ensemble des pays producteurs, et une source de revenus non négligeable pour les familles d'agriculteurs. Mes parents ont d'ailleurs réussi à financer mes études supérieures grâce à cette culture. Les stratégies mises en place par les autorités Camerounaises pour promouvoir la marque Cameroun, consistent à optimiser la récolte, à sécuriser les revenus des producteurs, à multiplier les plants et à minimiser les intrants. Dans ce contexte, le Laboratoire de Physiologie et Biochimie de l'Ecole Normale Supérieure de Yaoundé s'inscrit dans la logique de multiplication des plants, avec pour thématique l'amélioration des conditions de culture in vitro de cacaoyers sélectionnés, afin de mettre à la

disposition de producteurs des variétés améliorées, saines et productives. Dans cette optique, mon travail a consisté à rechercher des activateurs de l'embryogenèse somatique, qui est la technique de multiplication végétative permettant de pallier les problèmes causés par l'allogamie du cacaoyer. Ainsi, depuis mon intégration dans ce laboratoire, en 2004, des collaborations fructueuses ont été établies, avec le Département des Sciences de la Culture et de l'Ecologie des plantes à Hambourg (Allemagne), le Centre National de Recherche Agronomique d'Abidjan (Côte d'Ivoire) et le Département d'Horticulture, Collège des Sciences Agricoles de Pennsylvanie (USA).

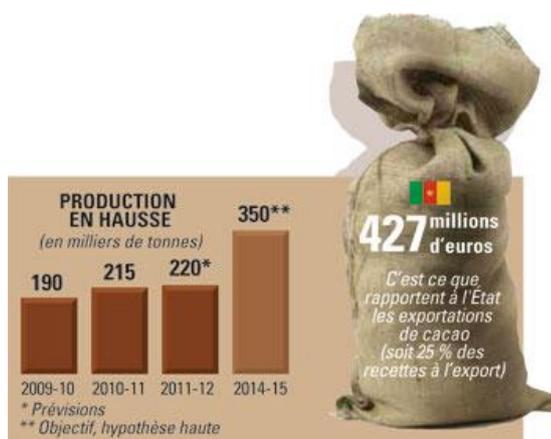


Figure B : Production du cacao au Cameroun, obtenue jusqu'en 2012 et prévue jusqu'en 2015.

Pour mener des analyses d'histochimie et utiliser des techniques de pointes pour les analyses biochimiques des arabinogalactanes protéines, j'ai recherché une nouvelle collaboration. Un contact a été établi avec le Docteur S. Lhernould, Maître de Conférences au Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles (LCSN), à l'Université de Limoges. Madame Lhernould a accepté de codiriger, avec le Docteur G. Costa, mon travail de thèse inscrit dans l'étude de l'implication des arabinogalactanes protéines au cours de l'embryogenèse du cacaoyer. Une bourse UNESCO L'OREAL, pour les Femmes et la Science, m'a permis d'effectuer le déplacement depuis Yaoundé et réaliser le travail à Limoges de 2010 à 2012.

Les cultures initiées au Cameroun ont eu du mal à s'adapter la première année au LCSN. Après une optimisation et une adaptation des conditions de culture, j'ai réussi à obtenir des embryons somatiques. Après avoir défini les critères d'identification des stades de développement des embryons produits, des analyses biochimiques ont été réalisées pour détecter et purifier les arabinogalactanes protéines (AGPs). Les variations de ces protéoglycane, présentées comme molécules activatrices de l'embryogenèse, ont pu être suivies par une méthode facilement accessible que nous avons mise au point et ainsi, leur implication a pu être mise en évidence au

cours du développement embryonnaire. Au final, l'approche appliquée, étroitement associée à l'approche fondamentale consisterait à apporter des AGPs purifiées aux cultures de cacaoyer pour favoriser la synchronisation de la production d'embryons somatiques.

*PARTIE A. REVUE
BIBLIOGRAPHIQUE*

I. LE CACAOYER

I.1. Origine

Le cacaoyer est une plante native de la forêt humide d'Amérique du Sud. Certains auteurs situent sa zone de dispersion dans les vallées des bassins de l'Amazonie et de l'Orénoque. Pour Cheesman (1944) le cacaoyer est originaire de la haute Amazonie. Les travaux de Motamayor (2002) confirment l'hypothèse de Cheesman (1944). Le cacaoyer a été domestiqué par les indiens d'Amérique centrale au XVI^e siècle (Eskes et Lanaud, 1997). Les Mayas et les aztèques sont les premiers à cultiver cette plante. Le cacaoyer est introduit en Afrique de l'Ouest, à partir du Ghana, au 18^{ème} siècle (Braudeau, 1969), et sa culture est pratiquée au Cameroun depuis 1892 par les colons allemands (Assoumou, 1977).

I.2. Taxonomie et diversité

I.2.1. Taxonomie

Le cacaoyer appartient à la classe des Magnoliopsidae, les résultats de la systématique moléculaire le classe dans l'ordre des Malvales. (Alverson et al., 1999, Whitlock, 2001; Sousa Silva et Figueira, 2005).

Le genre *Theobroma* est divisé en six sections: *Andropetalum*, *Glossopetalum*, *Oreanthes*, *Rhytidocarpus*, *Telmatocarpus* et *Theobroma*. Cette division basée sur les caractéristiques morphologiques (Cuatrecasas, 1964) est confirmée par des données moléculaires (Borrone et al., 2007; Soussa Silva et Figueira 2005). Les six sections comportent 22 espèces qui sont toutes pérennes, et à port dressé. On peut citer: *T. bicolor*, espèce cultivée localement en Amérique centrale, *T. speciosum*, *T. subinacum*, *T. obovatum*, *T. mammosum*, *T. canumanense*, *T. sylvestre*, *T. glaucum*, *T. cirmolinae*, *T. grandiflorum* cultivées en Colombie et au Brésil et *T. cacao*, espèce la plus cultivée dans le monde (Santos et al., 2012) et, qui fera l'objet de notre étude.

I.2.2. Diversité génétique

T. cacao est une espèce diploïde ($2n=20$). Son génome contient 430 Mb (Argout et al., 2011). Les caractéristiques morphologiques et l'origine géographique permettent de différencier deux grands groupes génétiques de cacaoyer: les Criollo, et les Forastero dont les plus cultivés sont les Amelonado (Fig. 1). L'hybridation naturelle entre les deux groupes a donné un troisième groupe les Trinitario (Cheesmann, 1944). Cette classification a été revue grâce l'analyse de 1241 accessions, couvrant un large échantillonnage géographique traité par 106 marqueurs microstellites par Motamayor et al. (2008). Ainsi, dix groupes : Marañon, Curaray, Criollo, Iquitos, Nanay, Contamana, Amelonado, Purús, Nacional et Guiana sont répertoriés. Ils se distinguent les uns des autres par leur origine géographique et leur structure génétique.

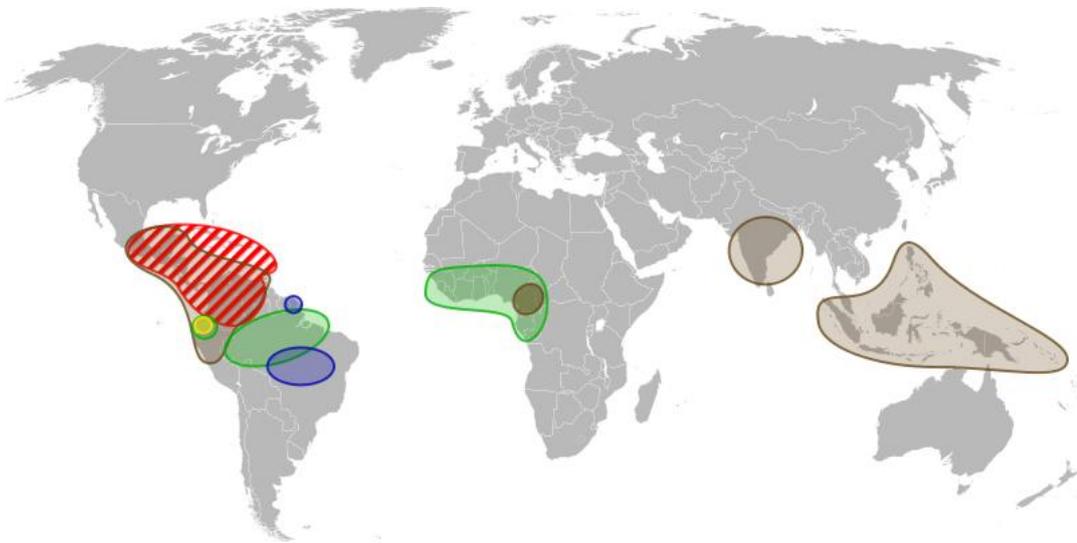


Figure 1 : Répartition géographique de la culture du cacaoyer dans le monde  Criollos ;  Trinitarios;  Forasteros ;  Cupuaçu ;  Nacional

Source http://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:Cacao_species_-_World_distribution_map_-blank.svg

I.3. Biologie du cacaoyer

Theobroma cacao L. est une plante pérenne qui peut atteindre 25 m de hauteur à l'état sauvage (Lachenaud et al., 2007). Les feuilles persistantes simples, entières, elliptiques, sont molles et rougeâtre à l'état jeune. A maturité elles sont glabres et d'un vert foncé. Le limbe à nervation pennée, peut atteindre 15 à 40 centimètres de long et 4 à 15 centimètres de large. Les feuilles sont distribuées selon une phyllotaxie 3/8 avec une durée de vie d'un an. Le cacaoyer est cauliflore, les inflorescences apparaissent sur des coussinets floraux, qui sont des renflements du

tronc ou des branches (Swanson et al., 2008). Les fleurs de petite taille sont hermaphrodites, régulières, pentamères formées de cinq sépales, cinq pétales et cinq étamines alternant avec cinq staminodes stériles. Les pétales sont composés de deux parties distinctes, la cuculle attachée au réceptacle floral et la ligule. Les anthères sont recouvertes par les cuculles et produisent des pollens dont la durée de vie n'excède pas 48 heures (Paulin, 1994). Ces fleurs sont à ovaire supère comptant 30 à 60 ovules. L'arbre peut produire annuellement jusqu'à 100 000 fleurs et seulement environ 1/500 donnera des fruits.

Le fruit de cacaoyer est une baie indéhiscente de forme fusiforme appelée chérelle au jeune âge et cabosse à l'âge adulte. Ce fruit reste attaché à l'arbre par son pédoncule fortement lignifié. Une cabosse ouverte présente une placentation axillaire avec des graines disposées en cinq rangées, entourées d'une pulpe mucilagineuse. Le péricarpe est constitué de l'extérieur vers l'intérieur de l'épicarpe, du mésocarpe et de l'endocarpe. On dénombre 30 à 60 graines par cabosse (Eskes et Lanaud, 1997; Santos et al., 2012). Les graines entourées d'une pulpe mucilagineuse sont reliées au placenta par des funicules. Elles reçoivent les assimilats grâce aux faisceaux vasculaires du funicule et des tissus du hile (Vinogradova et Falaleev, 2012). La période de maturation dépend des conditions climatiques et des génotypes, ainsi elle peut être d'environ 161 jours pour les Forastero (Scavina) et de 210 jours pour les Trinitario (ICS) (Cilas, 1991).

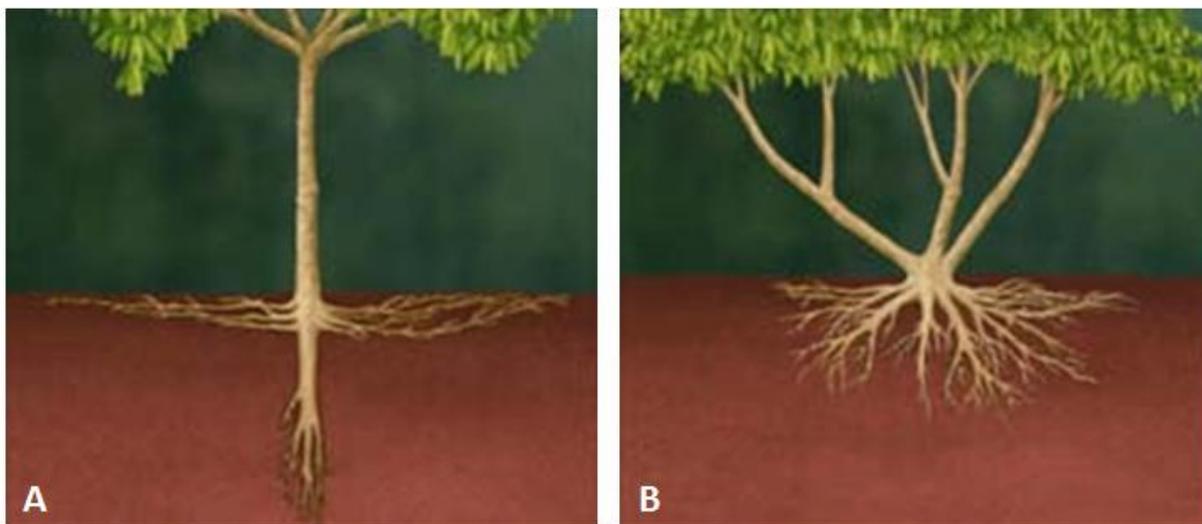


Figure 2 : Représentation schématique du développement du système racinaire de cacaoyer obtenu à partir d'un embryon (A), d'une bouture (B).

Source : <http://www.afd.be/~plant-ch/cacaoyer/conaiss/SRcacao.htm>

Le système racinaire très développé comporte une racine pivotante très profonde issue du développement de la radicule de l'embryon et de nombreuses racines adventives portant des poils absorbants (Fig. 2A). Tandis que, les plants issus du bouturage présentent un enracinement fasciculé (Fig. 2B).

I.4. Ecophysiologie et Culture

Le cacaoyer se développe en moyenne altitude entre les latitudes 15° Sud et 20° Nord. Pour un bon développement la plante a besoin d'un sol aéré et profond (1,5 m minimum) de texture sablo-argileuse ayant une grande capacité de rétention d'eau, et un pH compris entre 6 et 7 (Wood, 1985). La pluviométrie annuelle doit être comprise entre 1250 et 3000 m³ et la répartition des pluies uniforme, avec une saison sèche ne dépassant pas 3 mois. Un ombrage de 50%, une température comprise entre 24 et 28°C, une atmosphère humide et une hygrométrie constante et élevée sont également indispensables à son développement.

Les fèves placées dans les conditions favorables germent au bout de 15 jours. La germination est épigée et donne une plantule formée d'un axe orthotrope (Fig. 2 A). A partir d'environ 1,2 m de hauteur la croissance apicale cesse et la plante développe des branches plagiotropes. Au stade de 4 à 5 ramifications, les premières fleurs se développent. Elles apparaissent tout au long de l'année, par périodes successives et pendant toute la vie de la plante (Aneja et al., 1999). Les sépales des fleurs s'ouvrent sous l'effet de la chaleur et du froid, leur déhiscence débute à la fin de l'après midi et est complète le lendemain matin. Cette période est favorable à la pollinisation (Aneja et al., 1999).

Les fleurs contiennent des composés phénoliques tels que l'acide hydroxycinamique, des tannins et des anthocyanes. Les anthocyanes présentes dans l'épiderme des staminodes et les pétales servirait uniquement à l'ornement (Alemanno et al., 2003). Le cacaoyer est fortement auto-incompatible (Royaert et al., 2011) et la pollinisation naturelle est essentiellement entomophile. Le pollen est gluant et forme des amas difficilement transportables par le vent.

Le cacaoyer atteint son plein développement vers l'âge de dix ans. Il est cependant productif bien avant cet âge puisque les fleurs et les fruits apparaissent dès la troisième ou quatrième année après le semis. La maturation des fruits s'effectue selon les génotypes pendant 5 à 7 mois. Un arbre produit en moyenne 150 cabosses par an, soit environ 6 kg de cacao marchand.

I.5. Importance du cacao

Depuis les Mayas jusqu'à nos jours, le cacao a pris une place importante dans la vie des producteurs et des consommateurs.

I.5.1. Importance socioculturelle

Le cacaoyer est cultivé pour ses fèves utilisées comme matières premières dans la fabrication des produits alimentaires, pharmaceutiques ou cosmétiques. Le cacao a longtemps été assimilé à un aliment/médicament (Dillinger et al., 2000). L'utilisation médicinale du cacao ou du chocolat, a été diffusée d'Amérique latine en Europe au milieu des années 1500. Le cacao aurait des vertus pour la stimulation du système immunitaire; l'amélioration de la digestion et la détoxification cellulaire. Des préparations à partir des fleurs, des écorces des feuilles ou du beurre sont utilisées contre la fatigue ou pour traiter les troubles intestinaux et les irritations de la peau (Dillinger et al., 2000).

Les fèves torréfiées, associées au piment, à la farine de maïs et à l'eau chaude, constituaient un breuvage appelé «chocolatl» apprécié par les Mayas. De nos jours le chocolat reste un produit très prisé. Le piment est remplacé par le sucre et la vanille. Les produits contenant du cacao possèdent des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes bénéfiques à la santé humaine. Les effets bénéfiques du cacao sur le cancer, le contrôle du diabète, les maladies cardio-vasculaires et la prévention des hépatites ont été rapportées dans plusieurs travaux de recherche (Arlorio et al., 2009; Rusconi et Conti, 2010; Sarmadi et al., 2011, 2012).

I.5.2. Importance économique

Dans la civilisation préclassique des amérindiens, le cacao a joué plusieurs rôles. En Amérique centrale, les fèves ont servi de monnaie d'échange. Les Mayas les utilisaient pour payer leurs impôts auprès des Aztèques. De nos jours, la culture du cacaoyer est une source de devises pour les pays producteurs. La production mondiale du cacao est assurée à 70% par l'Afrique. Le Cameroun couvre 5,3% de cette production et est 5^{ème} derrière la Côte d'Ivoire, le Ghana, l'Indonésie et le Nigéria (Fig.3).

Au Cameroun l'exportation du cacao représente 16,1% des exportations totales du pays. En 2010, la production s'élevait à 264 077 tonnes soit environ 11% de plus qu'en 2009 (FAO,

2012). Le cacao est consommé principalement en Europe où l'importation atteint 45% de la production mondiale.

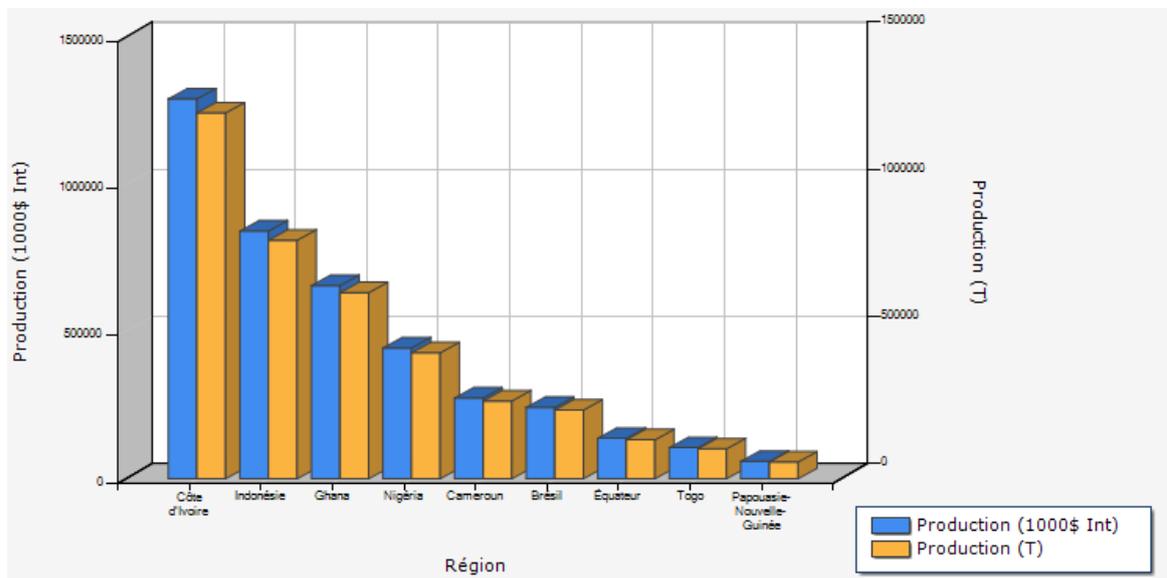


Figure 3 : Production mondiale des fèves de cacao par pays pour l'année 2010.

Source : http://faostat.fao.org/DesktopModules/Faostat/Images/T20/ChartPic_0i1brtakf1eb6jt9vcqv.png?db130085-f5a6-43f6-835d-c5d6f53bdb06

La productivité des cacaoyers est affectée non seulement par les facteurs climatiques, mais aussi par de nombreuses maladies et ravageurs qui attaquent la plante.

I.6. Maladies et ravageurs du cacaoyer

I.6.1. Maladies

Les différentes maladies sont responsables de la perte d'environ 50% de la production:

La pourriture brune des cabosses dont l'agent responsable est un Oomycète du genre *Phytophthora* provoque des dégâts pouvant s'élever à 90 ou 100% de perte de la production en fonction des zones de culture, du génotype, de la souche pathogène et des conditions environnementales (Iwaro et al., 1997). Plusieurs espèces de *Phytophthora* ont été identifiées parmi lesquelles quatre : *P. palmivora*, *P. capsici*, *P. megakarya*, *P. cytophthora* affectent le cacaoyer. La pourriture brune se manifeste par l'apparition de lésions brunes sur les fruits et un revêtement sporifère au bout d'une semaine d'infection. *Phytophthora megakarya*, présent uniquement en Afrique, est l'espèce la plus prépondérante au Cameroun (Nyassé, 1999). Cependant, l'espèce la plus répandue est *Phytophthora palmivora*. Elle cause des dégâts directs

dans le mésocarpe, mais aussi indirecte au niveau des jeunes feuilles, des fleurs, des racines et du tronc sur lequel il provoque des chancres (Thevenin et al., 2012).

Le balai de sorcière, causée par un champignon, *Moniliophthora perniciosa* (Aime et Phillips-Mora, 2005, Meinhardt et al., 2008), est une maladie répandue dans les Caraïbes et en Amérique du Sud. Le pathogène infecte les tissus méristématiques, ce qui provoque la prolifération anarchique des rameaux, des coussinets floraux et des fruits. Les cabosses sont peu développées et pourrissent sur l'arbre avant maturité.

La moniliose est causée par un champignon, *Moniliophthora roreri*, originaire des pays andins. Dans les conditions naturelles, la moniliose affecte uniquement les cabosses. Les fruits infectés présentent des fèves nécrosées et compactes.

Le dépérissement avec nécrose vasculaire, due à *Oncobasidium theobromae* (Samuels et al., 2012), sévit en Asie du Sud et Asie du Sud-Est. Le champignon s'attaque au tissu vasculaire au niveau des racines et des branches, mais les symptômes apparaissent au niveau des feuilles et se manifestent par une chlorose. Il est responsable de la mort et la chute des feuilles, la mort des rameaux, puis de l'arbre entier.

L'œdème des pousses est causé par le complexe viral de l'œdème des pousses (Muller et al., 2001). C'est la principale maladie virale d'importance économique connue chez le cacaoyer. Cette affection est transmise par des cochenilles farineuses et se manifeste par une sclérose des feuilles et le gonflement des tiges et des racines des arbres infectés. Il sévit en Afrique de l'ouest et les dégâts les plus importants sont observés au Ghana.

I.6.2. Ravageurs

Le cacaoyer est une espèce sensible aux insectes. Les plus fréquents sont les piqueurs, en particulier les mirides (*Sahbergella sp.*, *Distanhella sp.* et *Helopeltis sp.*). Ils attaquent les jeunes pousses et les cabosses.

Conopomorpha cramerella est un insecte foreur des cabosses (Wielgoss et al., 2012). Les pentatomes, les cicadelles et les thrips sont également des insectes nuisibles du cacaoyer. Les cochenilles sont des vecteurs de virus de l'œdème de pousse.

Les larves des pyralidés s'attaquent aux cabosses. Les plantes parasites, tel que le gui (Eskes et Lanaud, 1997), sont responsables de la baisse de la production des cacaoyers.

Pour améliorer la production, diverses techniques sont utilisées, parmi lesquelles la lutte biologique pas très accessible aux producteurs, et l'utilisation rationnelle des pesticides. Le développement et l'utilisation des variétés résistantes, ou tolérantes aux maladies et aux ravageurs, permettent une protection durable des vergers.

I.7. Techniques de sélection de cacaoyers à haute valeur agronomique

Les sélectionneurs utilisent plusieurs critères tels que la résistance aux maladies (Mcmahon et al., 2009), les propriétés organoleptiques (Deheuvels et al., 2004), ou le rendement. Cependant, d'autres caractères tels que la précocité et la vigueur sont également prises en compte. Plusieurs méthodes de sélection sont utilisées.

I.7.1. Identification du matériel génétique

Les premières identifications de cultivars de *Theobroma cacao* L. étaient basées sur l'observation des caractères agromorphologiques (phénotypes), eux même fortement influencés par des facteurs externes. Les analyses actuelles se servent des outils moléculaires basés sur l'analyse de l'ADN. L'utilisation des sondes moléculaires, telles que les microsatellites, permet d'identifier et d'évaluer la distance génétique entre les cultivars (Motamayor et al., 2008; Santos et al., 2012). D'autres marqueurs moléculaires tels que le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP), le polymorphisme nucléotidique (SNP), et l'amplification aléatoire d'ADN polymorphe (RAPD), permettent également de cartographier les gènes.

I.7.2. Création d'hybrides

C'est une méthode de sélection générative souvent appliquée à l'amélioration du cacaoyer. Elle est basée sur la création d'hybrides à partir de clones issus de génotypes différents possédant des caractères agronomiques recherchés. Une hétérosis positive a été observée chez les hybrides pour le rendement, la vigueur, la précocité, la résistance aux maladies (Djougoué et al., 2007), mais l'hétérozygotie des parents induit une forte hétérogénéité chez les descendants et une transmission variable des caractères. Pour augmenter la fréquence des gènes favorables dans les populations, le sélectionneur utilise la sélection récurrente (Pang et Lockwood, 2008).

I.7.3. Sélection assistée par les marqueurs moléculaires

Les marqueurs moléculaires permettent une identification plus précise des génotypes. Associé à des locus quantitatifs exprimant des traits de caractère (QTL), la génomique fonctionnelle permet d'étudier la diversité génétique des populations de cacaoyer et de sélectionner les variétés présentant les caractères agronomiques et organoleptiques souhaités par les consommateurs (Micheli et al., 2010). Après la sélection, les génotypes intéressants doivent être multipliés en vue d'une distribution aux producteurs.

I.8. Techniques de multiplication des cacaoyers

I.8.1. Multiplication végétative traditionnelle

Chez le cacaoyer, la multiplication végétative traditionnelle se fait par greffage (Gervais, 1981) ou par bouturage des fragments de tige orthotropes (Amefia et al., 1985). L'usage des boutures n'est admise qu'en station de recherche pour l'implantation des champs semenciers (Koko et al., 2011). L'absence de racine pivotante chez les cacaoyers issus du bouturage, les rend sensibles au déficit hydrique et aux vents violents. Le greffage est fastidieux, il nécessite beaucoup d'espace pour une production à grande échelle.

I.8.2. Culture *in vitro* du cacaoyer

Les techniques de cultures *in vitro* permettent une production de matériel végétal sain à grande échelle dans un espace réduit. Deux techniques sont appliquées au cacaoyer : le micro-bouturage et l'embryogenèse somatique.

Les plantes résultantes du micro-bouturage ne développent pas de racine pivotante, indispensable à un enracinement profond permettant à la plante de résister au déficit hydrique temporaire et aux grands vents. A partir des embryons somatiques, Traoré et al. (2003) ont obtenu des plantules possédant des racines pivotantes. Cette voie de multiplication est prometteuse.

L'induction d'embryons somatiques a été décrite pour la première fois chez le cacaoyer par Esan (1975), mais n'a pas permis tout de suite l'obtention des plantes entières. Les travaux effectués par la suite ont révélé un potentiel embryogène de divers tissus de la plante : les feuilles (Litz, 1986), le nucelle (Figueira et Jannick, 1993), les cotylédons immatures d'embryons zygotiques (Omokolo et al, 1997). Mais, l'exploitation des tissus sporophytiques est

limitée par l'influence du génotype et la faible vitesse de conversion des embryons (Guiltingan et Maximova, 2000). Des résultats intéressants ont été obtenus avec les pièces florales, les staminodes et pétales (Lopez-Baez et al., 1993; Alemanno et al., 1996 et 1997; Li et al., 1998). Après l'identification du meilleur explant, les recherches ont porté sur la source de carbone (Traoré et al., 2006), les phytohormones et la composition minérale du milieu de culture (Tan et Furtek, 2003; Minyaka et al., 2008). L'embryogenèse zygotique a été également étudiée en vue de comparer le milieu nutritif naturel de l'embryon au milieu de culture artificiel (Dangou et al., 2002; Emile et al., 2007).

Maximova et al., (2002) a montré que les embryons somatiques secondaires sont d'origine unicellulaire. L'embryogenèse somatique secondaire permet d'obtenir des embryons présentant moins d'anomalie que les embryons primaires. La culture par immersion temporaire et la culture en suspension permettent d'accroître la multiplication des embryons chez le cacaoyer (Niemenak et al., 2008; 2012). Ces travaux ont permis d'améliorer cette technique qui permettrait d'assurer une meilleure régénération des clones de cacaoyer sélectionnés (De Silva et al., 2008).

Au-delà du développement asynchrone des embryons, la réponse à tous ces facteurs exogènes reste étroitement liée au génotype. L'étude des facteurs endogènes, qui seraient à l'origine des réponses différentielles, est donc envisagée à différents stades de développement des embryons.

II. EMBRYOGENESE

La vie d'un être vivant passe par l'embryogenèse, l'acquisition de l'état adulte, la sénescence et la mort. L'embryogenèse qui décrit le développement de l'embryon prend ainsi une place importante dans la vie des plantes. Son intérêt économique dans l'agriculture a fait de l'embryogenèse végétale un sujet d'étude qui intéresse également les sélectionneurs. Chez les végétaux, l'embryogenèse peut débuter par une fécondation ou non. Toutefois, les embryons traversent plusieurs états comparables au cours de leur développement.

II.1. Organisation générale du développement embryonnaire

Au cours de l'embryogenèse, l'embryon acquiert un « patron » morphologique qui conditionne le plan d'organisation de la plante adulte. La différenciation morphologique s'organise autour de deux axes : un axe apico-basal pour les organes embryonnaires et un axe radial pour les couches de tissus (Jürgens, 1996). L'axe apico-basal permet de distinguer du haut vers le bas : le méristème apical, les cotylédons, l'hypocotyle, la radicule et le méristème racinaire. Tandis que l'axe radial permet une organisation concentrique autour de l'axe apico-basal. De la périphérie vers le centre, on distingue l'épiderme, le cortex, l'endoderme, le péricycle et les tissus vasculaires. La transition entre la symétrie radiale et la symétrie bilatérale est sous le contrôle des facteurs d'origine maternelle (Zimmermann, 1993), lorsque le tissu maternel existe, mais dépend aussi des facteurs internes à l'embryon. La polarité de l'embryon est influencée non seulement par son gradient auxinique, mais aussi par des glycoprotéines sécrétées par les cellules ou présentes dans le milieu de culture (Van Engelen et De Vries, 1992).

Le développement des embryons somatiques passe par les mêmes phases de développement que les embryons zygotiques. L'évolution de la morphologie de l'embryon au cours de son développement a permis de différencier plusieurs stades de développement.

II.2. Stades de développement des embryons

Les critères morphologiques permettent de distinguer quatre stades de développement importants (Egertsdotter et Arnold, 1998):

Stade globulaire, caractérisé par une organisation concentrique conduisant à la mise en place de la symétrie radiale de l'embryon.

Stade cordiforme, caractérisé par le passage d'une symétrie radiale à une symétrie bilatérale

Stade torpille établie suite au développement des ébauches cotylédonaire de part et d'autre du méristème apical. Toutefois, l'embryon n'a véritablement pas grossi à ce stade.

Stade cotylédonaire, au cours duquel les cotylédons croissent rapidement. L'axe embryonnaire autour duquel s'organise la symétrie bilatérale s'allonge et les tissus parenchymateux et vasculaires se différencient.

Pour définir les stades de développement des embryons somatiques, les caractères morphologiques peuvent être associés aux jours de culture dans le cas d'un développement synchrone. Les embryons présentent des morphologies différentes après un nombre donné de jours de culture (Fig. 4) (Mishra et al., 2012).

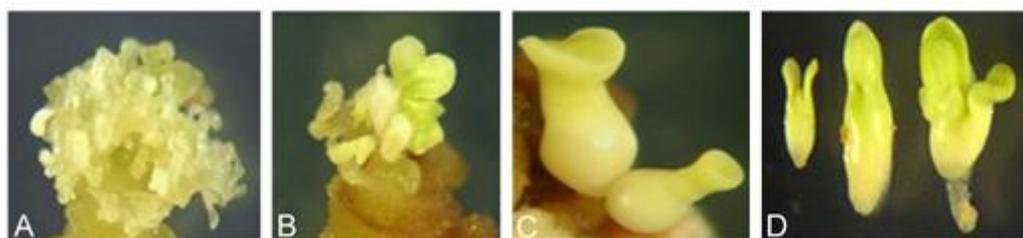


Figure 4 : Différents stades de développement des embryons du pois chiche présentant la morphologie associée aux jours de culture. A – stade globulaire (15 - 22 J), B – stade cordiforme (22 - 32 J), C – stade torpille (32 - 42 J), D – stade cotylédonaire (38 - 48 J) (d'après Mishra et al., 2012).

Afin d'étudier les mécanismes physiologiques et biochimiques qui accompagnent le développement des embryons, des critères physiologiques ont été associés aux critères morphologiques pour séparer les stades de développement. Ainsi, on a pu séparer la phase d'embryogenèse précoce de la phase de croissance et de maturation des embryons. L'embryogenèse précoce correspond à la formation du « patron » de l'embryon et regroupe les trois premiers stades, c'est l'étape de la morphogenèse.

Les phases de croissance et de maturation étalées sur les stades cotylédonaire sont caractérisées par une croissance rapide et par une différenciation des cellules du cortex et de l'endoderme qui vont accumuler les protéines et les lipides de réserve.

Après le stade de maturation les embryons zygotiques, contrairement aux embryons somatiques, sont capables de dessiccation, ce qui constitue l'une de leurs particularités.

II.3. Particularités de l'embryogenèse zygotique

L'embryogenèse zygotique diffère de l'embryogenèse somatique par les phénomènes marquant la formation de l'embryon (fécondation) et la fin de son développement (dessiccation).

II.3.1. Premières étapes du développement du zygote

L'embryon des plantes à fleurs se développe après une double fécondation qui a lieu dans le sac embryonnaire. L'un des deux noyaux spermatiques fusionne avec le noyau haploïde de l'oosphère pour former le zygote diploïde. L'autre noyau mâle s'unit aux deux noyaux polaires haploïdes de la cellule centrale pour former l'albumen à partir d'un cénocyte. A partir de cette cellule multi-nucléée, unique aux plantes, une cellularisation se produit ensuite (Dumas et Rogowsky, 2008). La première division du zygote donne deux cellules qui seront à l'origine de l'embryon zygotique et du suspenseur. Ce dernier meurt au cours du développement de l'embryon, mais sa partie la plus apicale fera partie de la radicule de l'embryon.

II.3.2. Dessiccation et dormance des graines

Contrairement aux embryons somatiques, les embryons zygotiques présentent une expansion massive des cotylédons chez les dicotylédones. Ces cotylédons sont le lieu de stockage des réserves nutritives qui seront utilisées par la jeune plantule au moment de la germination, après une période de dormance.

La dormance est un état de repos physiologique permettant aux graines d'achever la maturation et d'attendre les bonnes conditions climatiques pour germer. Pour atteindre ce repos physiologique, la graine doit perdre environ 90 % de sa teneur en eau. La déshydratation induit le ralentissement de l'activité physiologique qui prépare la graine à la phase de dissémination. Lorsque les conditions extérieures d'eau et d'oxygène sont remplies, la graine germe.

II.4. Particularités de l'embryogenèse somatique

L'embryogenèse somatique est le processus au cours duquel les cellules diploïdes différenciées se dédifférencient et se développent pour former un embryon bipolaire. Basée sur la totipotence cellulaire, elle traduit la capacité des cellules végétales à reprogrammer le schéma normal de développement somatique en développement embryogénique, conduisant à la formation de structures ressemblant aux embryons zygotiques (Ledwón et Gaj 2011). Il existe deux voies

d'induction de l'embryogenèse somatique : l'embryogenèse somatique directe qui nécessite une reprogrammation minimale des cellules compétentes et l'embryogenèse somatique indirecte qui nécessite une plus grande reprogrammation des cellules (Karami et al., 2009). Les embryons somatiques ne présentent pas de phase de déshydratation comme les embryons zygotiques et se développent directement en plantules, ils en diffèrent aussi par leur origine.

II.4.1. Origine de l'embryon somatique

Les embryons somatiques peuvent être initiés à partir de différents types d'explants constitués de tissus diploïdes. Au cours de l'embryogenèse somatique directe, les embryons sont produits directement sur les explants en culture. Dans le cas de l'embryogenèse somatique indirecte, la formation d'un cal est indispensable au développement des embryons. Le suspenseur des embryons zygotiques est remplacé, dans ce cas, par une ou plusieurs cellules allongées et vacuolisées (Emons, 1994). Les embryons obtenus à partir d'un explant prélevé sur la plante seront appelés embryons primaires. Les embryons somatiques produits à partir d'explants prélevés sur d'autres embryons somatiques sont dits embryons somatiques secondaires (Ogata et al., 2005, Karami et al., 2008).

L'embryogenèse secondaire permet une production embryogène répétitive et uniforme (Panaia et al., 2011). La réussite de l'embryogenèse somatique dépend de plusieurs facteurs responsables de l'acquisition par les cellules de la compétence à l'embryogénie.

II.4.2. Facteurs impliqués dans l'embryogenèse somatique

Les phytohormones qui peuvent être exogènes ou endogènes et certaines protéines agissent comme des facteurs stimulant l'acquisition du potentiel embryogène. L'auxine, reconnue pour son rôle dans l'embryogenèse (Fehér et al., 2003), est utilisée à une concentration supérieure à celle retrouvée dans les conditions naturelles. La plus utilisée est le 2,4-D, qui est une auxine de synthèse. Chez le cacaoyer, une concentration de 18 μM est nécessaire à l'induction des embryons somatiques. L'auxine serait impliquée comme messenger intercellulaire dans le processus de morphogénèse. Une autre hormone, l'ABA sert de messenger chimique aux réponses au stress et stimule l'embryogenèse somatique (Li et Qu, 2002).

D'autres molécules telles que les polyamines et l'éthylène impliquées dans la réponse au stress interagissent avec les phytohormones (Patnaik et Khurana, 2001; Baron et Stasolla, 2008).

Plusieurs protéines sont associées à l'embryogenèse somatique. C'est le cas de la germine, localisée dans la matrice extracellulaire, et des « heat shock proteins » associées aux stress abiotiques. L'élévation de leur taux serait associée à l'acquisition du potentiel embryogène. L'action des molécules signalées ci-dessus indiquent que l'embryogenèse somatique est une réponse des cellules en culture à un stress (Karami et Saidi 2010). Le stress est donc un facteur important qui favorise l'embryogenèse somatique (Tonietto et al., 2012).

L'analyse du protéome et du transcriptome ont permis de caractériser plusieurs gènes impliqués dans l'embryogenèse somatique tels que les gènes SERK (Somatic Embryogenesis Receptor Kinase), LEC (Leafy cotyledon), baby boom, Algamous (De Olivaro Santos et al. 2005 ; Karami et al., 2009). Ces gènes seraient positivement régulés dans les stades tardifs du développement et seraient moins impliqués dans l'initiation de l'embryogenèse (Karami et al., 2009). Chez le cacao le gène LEC est absent dans les explants non embryogènes et participe à l'acquisition de la compétence à l'embryogenèse (Alemanno et al., 2003 ; 2008).

II.1. Rôle de la paroi dans le développement des embryons

La paroi est la première structure qui met la cellule en contact avec le milieu extérieur. Les cellules végétales adjacentes sont interconnectées par des plasmodesmes. Ils constituent des voies de communications intercellulaires permettant le transport sélectif des molécules diffusibles qui peuvent être morphogènes ou embryogènes. Ces canaux seraient plus actifs pendant les premiers stades de développement car une réduction de leur taille a été observée au stade torpille chez *Arabidopsis* (Jürgens, 1996 ; Kim et al., 2002). Les modifications appropriées et temporaires de la paroi permettent à la cellule de s'adapter aux conditions environnementales grâce à sa plasticité adaptative (Pien et al 2001).

III. ORGANISATION DE LA PAROI DES CELLULES VEGETALES CHEZ LES DICOTYLEDONES

La paroi est une structure qui fait, avec les compartiments vacuolaires et plastidiaux, la particularité de la cellule végétale. Longtemps considérée comme un élément passif, exerçant une protection de la cellule, elle joue en fait de multiples rôles. La paroi cellulaire est une matrice extra cytoplasmique dynamique. Ses fonctions ne sont pas uniquement structurales, elle est aussi, et notamment, une source de molécules «signal», impliquées dans divers processus physiologiques permettant l'élicitation de réactions de défense. Elle exerce une influence sur le développement du végétal, sur sa morphologie et contribue à la spécialisation fonctionnelle des types cellulaires. Ainsi, la modulation et l'interaction de ses divers constituants font d'elle un compartiment particulièrement actif au cours du développement de la plante.

III.1. Description de la paroi

La paroi cellulaire est une structure organisée et complexe constituée de deux couches: une lamelle moyenne et une paroi primaire. Certaines cellules végétales acquièrent en plus une paroi secondaire. Dans les embryons, les cellules végétales peu spécialisées ne sont constituées que de paroi primaire. Les parois primaires de deux cellules adjacentes sont séparées par la lamelle moyenne.

La lamelle moyenne est la couche la plus externe de la paroi. Elle se forme lors de la cytotérièse à la fin de la mitose. Elle assure la cohésion entre les cellules pour former des tissus. Cette couche de la paroi est dépourvue de cellulose et est constituée principalement de substances pectiques. La callose y est présente de manière transitoire et semble impliquée dans le bon déroulement de la mitose (Thiele et al., 2009).

La paroi primaire, mise en place directement après la lamelle moyenne, est une structure relativement souple qui permet la croissance cellulaire. C'est un réseau constitué de cellulose, d'hémicelluloses, de pectines et de protéines (Fig. 5).

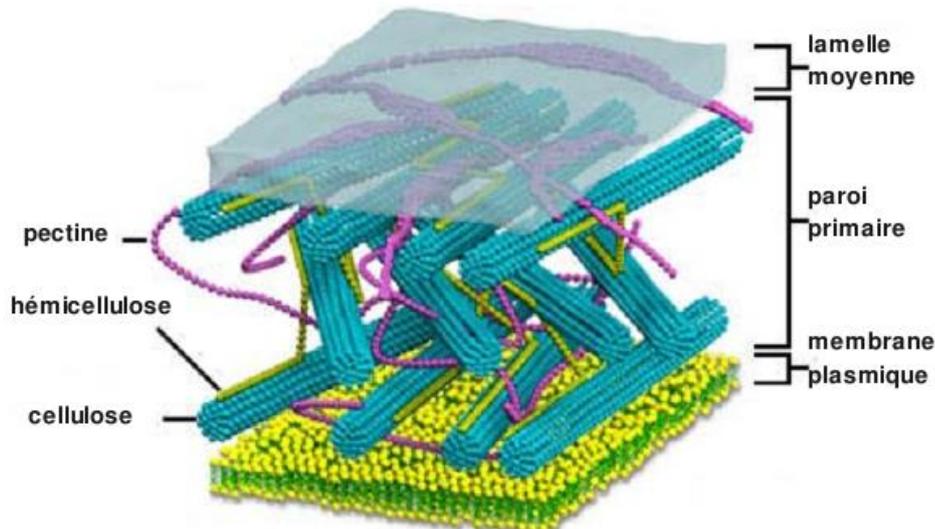


Figure 5 : Structure d'une paroi primaire.

Source: <http://micro.magnet.fsu.edu/cells/plants/cellwall.html>

La paroi secondaire existe chez les trachéophytes dans des tissus particuliers tels que les fibres, les trachéïdes et les vaisseaux de xylème. Située entre la paroi primaire et la membrane cytoplasmique, la paroi secondaire est formée de couches pariétales supplémentaires et se dépose sur la face interne de la paroi primaire une fois la croissance terminée. Elle est rigide, inextensible et essentiellement constituée de cellulose cristalline et de lignine. La paroi secondaire, de par sa rigidité, assure le soutien et la conduction de la sève xylémienne dans la plante.

III.2. Composition moléculaire de la paroi primaire

III.2.1. Polysaccharides

Les polysaccharides pariétaux représentent près de 90 % des constituants de la paroi. Ils comportent trois composés majeurs la cellulose, les hémicelluloses et les pectines.

III.2.1.1. Cellulose

La cellulose est un polymère formé d'un réseau de micro fibrilles. Chacune des micro fibrilles est constituée d'environ 36 chaînes parallèles de β (1-4) glucanes, stabilisées par des liaisons

hydrogènes intra et inter chaînes (Somerville, 2006). Dans la paroi primaire, la cellulose est constituée d'environ 8000 molécules de glucose. Elle est synthétisée dans la membrane plasmique par un complexe de cellulose synthase (Mutwill et al., 2008). C'est le biopolymère responsable de la structure de la paroi. Une accumulation faible de la cellulose a été observée dans la paroi des cellules compétentes à l'embryogenèse (Ochatt et al., 2010).

III.2.1.2. Hémicelluloses

Les hémicelluloses représentent 30% des polysaccharides pariétaux. Chez les angiospermes dicotylédones, les hémicelluloses sont essentiellement des xyloglucanes, constitués d'un polymère de résidus de β (1-4)-D-glucose. 75 % de ces résidus sont substitués en position O6 par des chaînes latérales de mono, di ou trisaccharides, formés de résidus de xylose, galactose et fucose. Chez certaines espèces végétales, le galactose peut être substitué par de l'arabinose (Vissenberg et al., 2000). Ces polymères sont synthétisés dans l'appareil de Golgi sous l'action de nombreuses glycosyltransférases. Les xyloglucanes se lient à la cellulose par des liaisons non covalentes. Elles sont essentielles pour l'expansion de la paroi et participent à sa rigidité. L'hydrolyse des xyloglucanes entraîne un relâchement nécessaire à la croissance des cellules. Ces polysaccharides se retrouvent également, comme chez le tamarin, dans certaines graines comme substances de réserve. Elles sont liées par des liaisons covalentes aux pectines (Thomson et al., 2000).

III.2.1.3. Pectines

Les pectines représentent 30 % de la matière sèche de la paroi primaire (O'Neill et al., 1990). Ce sont des polymères acides dont le squelette est constitué d'acides galacturoniques liés en α 1-4. Si les homogalacturonanes sont les pectines les plus abondantes, d'autres molécules, comme rhamnogalacturonane de type 1 ont une chaîne principale formée d'une alternance de rhamnose (1 à 4 %) et d'acide galacturonique. Les Rhamnogalacturonanes de type 1 et de type 2 présentent de plus des ramifications pouvant contenir des sucres rares (Fig. 6). Chez les dicotylédones, on trouve aussi des xylogalacturonanes qui contiennent du xylose dans leur structure.

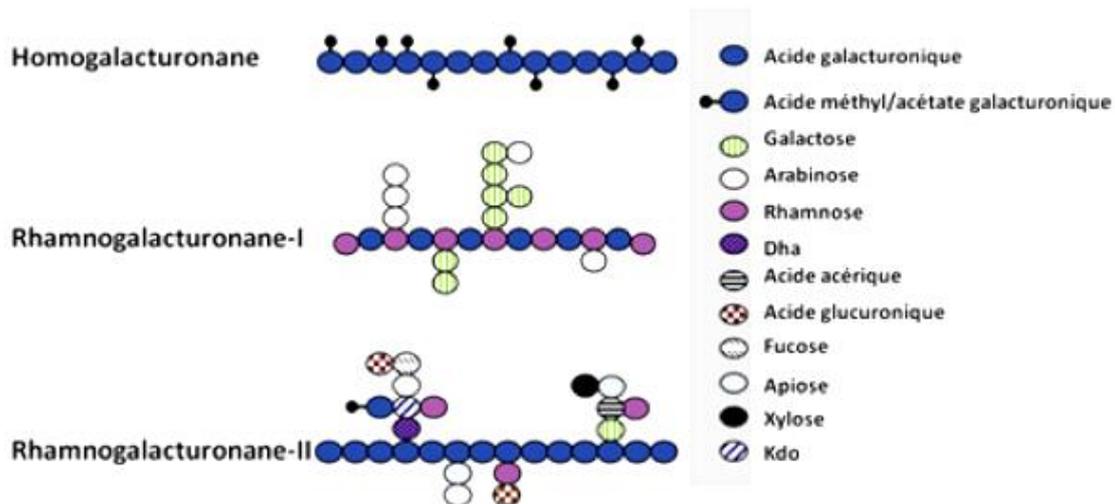


Figure 6 : Structure schématique des trois principaux polysaccharides de la paroi d'après (Palin et Geitmann, 2012). Kdo...Dha....

Les homogalacturonanes représentent environ 60 % des polymères pectiques de la paroi primaire. Ils peuvent être méthylestérifiés en C-6 ou O-acétylés en O-2 et O-3. (Fry et al., 1993). Lorsque le taux de méthylestérification est élevé on parle d'homogalacturonanes dans les pectines, ou d'acide homogalacturonique dans les acides pectiques. Les chaînes non méthylestérifiées, comportent une grande proportion de résidus galacturonates chargés et peuvent se complexer aux ions Ca^{2+} pour former des gels polysaccharidique au sein de la paroi.

Les rhamnogalacturonanes I principalement présentes dans la paroi primaire (Ermel et al., 2000) sont des pectines dont le squelette est formé de la répétition d'un dimère le α -L-Rhamnose-(1-4)- α -D-galacturonate. Les résidus rhamnosyl et galacturonyl peuvent être substitués par des arabinanes, des galactanes et des arabinogalactanes de type 1.

Les rhamnogalacturonanes II sont constitués d'une chaîne latérale formée d'environ 9 résidus de α -(1-4)-D-galacturonate sur laquelle viennent se fixer quatre chaînes latérales complexes (O'Neill et al., 2004). Le rhamnose est peu abondant et n'est présent que dans les chaînes latérales.

III.2.2. Protéines

Les protéines pariétales sont des composants essentiels de la paroi. Elles possèdent des caractéristiques physicochimiques qui leur permettent d'interagir avec les polysaccharides. On distingue donc des protéines labiles, faiblement liées ou fortement liées (Jamet et al., 2006). La

fonction de ces protéines permet de les regrouper en deux grandes catégories : les enzymes et les protéines de structure.

III.2.2.1. Enzymes

La paroi cellulaire contient de nombreuses enzymes qui lui confèrent des propriétés dynamiques telles que la plasticité ou l'extensibilité (Crosgrave, 1999). Une approche fonctionnelle permet de distinguer plusieurs groupes de protéines.

Les enzymes agissant sur les polysaccharides qui regroupent les hydrolases de glycosides, les estérases et lyases de carbohydrates. Elles interviennent dans le remodelage des polysaccharides.

Les oxydo-réductases qui renferment les peroxydases impliquées dans l'élongation cellulaire.

Les protéases qui interviennent dans le métabolisme des protéines pariétales et la libération des signaux peptidiques (Albenne et al., 2009).

III.2.2.2. Protéines structurales

La nature des acides aminés qui entre dans la constitution des protéines de structure permet de les regrouper en trois principales classes : Les protéines riches en glycine (GRPs), les extensines et les protéines riches en hydroxyproline/proline (HPRPs).

les protéines riches en glycine. Les protéines riches en glycine forment une famille de protéines composées de la répétition d'un motif Glycine-X où X peut être soit Alanine, Serine, Valine, Tyrosine, Phenyl alanine, Glutamine, Histidine. Ces protéines sont constituées de plus de 60 % de glycine (Moussavi et Hotta, 2005). La séquence peptidique de ces protéines est très variable d'une espèce végétale à une autre. Les GRPs s'exprimeraient de manière spécifique dans les cellules et sont majoritairement localisées dans le tissu vasculaire (Ringli et al., 2001). Elles ne sont pas présentes dans toutes les parois cellulaires et confèrent des propriétés spécifiques à celles qui la contiennent (Ringli et al., 2001).

les glycoprotéines riches en hydroxyproline (HPRGPs). Les HPRGPs sont des protéines O-glycosylées (Cassab, 1998) qui sont sous la forme insoluble dans l'apoplasme et soluble dans le symplasme. L'insolubilisation de ces molécules est provoquée par le stress et concourt à renforcer la paroi cellulaire dans le but de contribuer à la défense de la plante (Deepak et al., 2010). Cette super famille des glycoprotéines est caractérisée par une séquence répétitive (Pro-Hyp-Val-Tyr-Lys)_n qui peut varier d'une famille à une autre. On en distingue trois grandes classes : les protéines riches en proline, légèrement glycosylées; les extensines, modérément

glycosylées et les AGPs, hyperglycosylées. Cependant, il existe aussi des HPRGPs hybrides et chimériques (Showalter et al., 2010).

Les protéines riches en proline (PRPs). Les PRPs sont des protéines comportant autant de proline que d'hydroxyproline. Elles sont riches en lysine, ce qui leur confère un caractère basique et leur teneur en tyrosine relativement élevée leur permet d'assurer des liaisons di-tyrosine (Brady et al., 1998). Ces protéines s'expriment préférentiellement dans certains organes tels que les racines, ou l'albumen (Showalter et al., 2010).

Les extensines. Ce sont des glycoprotéines qui se distinguent par la séquence de leurs acides aminés riches en tyrosine, proline, valine, sérine, histidine et lysine, avec en moyenne une proportion de proline de plus de 50 %. Ce sont des protéines basiques de par leur richesse en lysine qui sont capables d'interagir avec les groupements acides des pectines. La répétition des séquences Ser-(Pro)_n (n>3) et Tyr-Lys-Tyr détermine leur structure quaternaire. Elles favorisent les liaisons intra et intermoléculaires. Grâce aux différentes interactions dont elles sont capables, ces protéines participeraient à régulation de la croissance cellulaire (Hierl et al., 2012).

Les AGPs. C'est la sous famille la plus importante des HPRGPs caractérisées par une richesse en hydroxyproline, proline, alanine, sérine et thréonine. Elles comportent des motifs dipeptidiques caractéristiques, Hyp-Ala, Hyp-Ser, Hyp-Thr, Pro-Val, Pro-Gly, Pro-Thr. Les AGPs sont solubles dans l'eau et sont de nature acide. Ces molécules qui sont au centre de notre étude sont présentées dans la partie suivante.

IV. LES ARABINO GALACTANES PROTEINES

Les AGPs sont des protéoglycane constituées majoritairement de polysaccharides liés de façon covalente à la fraction protéique minoritaire.

IV.1. Structure des AGPs

Ces molécules complexes et très hétérogènes (Showalter et al., 2010) ont une structure chimique pas complètement élucidée. Elles sont constituées d'un noyau polypeptidique, qui représente de 1 à 10 % de la masse moléculaire (Clarke et al, 1979), sur lequel vient se fixer la partie polysaccharidique (Fig. 7).

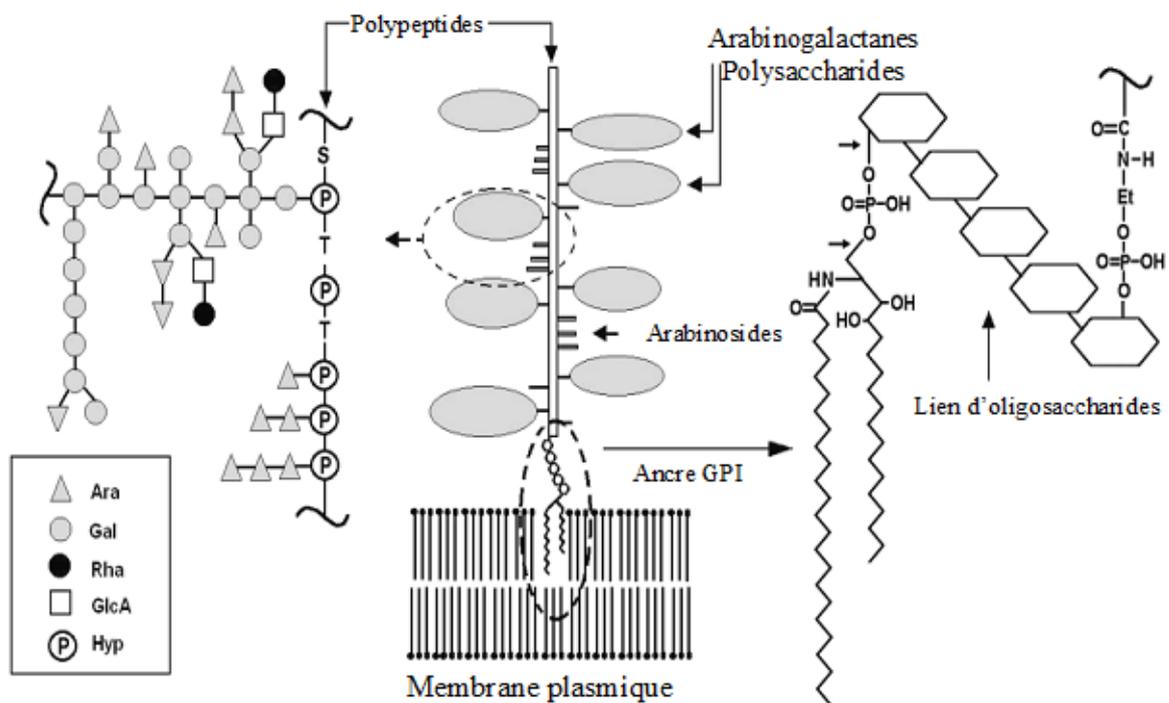


Figure 7 : Structure des arabinogalactane protéines. (Rumyantseva, 2005)

IV.1.1. Structure de la partie protéique

La partie protéique des AGPs est constituée en majorité de cinq acides aminés: alanine, glycine, thréonine, sérine et hydroxyproline/proline, qui représentent 80 % des acides aminés totaux de la protéine. La composition en acides aminés des AGPs a permis de les diviser en deux grands groupes: classiques et non classiques (Nothnagel, 1997, Schultz, 2000). L'analyse bioinformatique, grâce au programme BIO OHIO sur la base du protéome et du génome d'*Arabidopsis thaliana*, a permis une nouvelle classification des AGPs qui vient compléter celle proposée par Schultz et al. (2002). 85 AGPs ont été identifiées et regroupées en 6 classes (Fig. 8) : les AGPs classiques (22), les AGPs riche en Lys (3), les AGPs à domaine fascicline (21), les AG peptides (16), les AGPs chimériques (6) et les AGPs à plastocyanine (17).

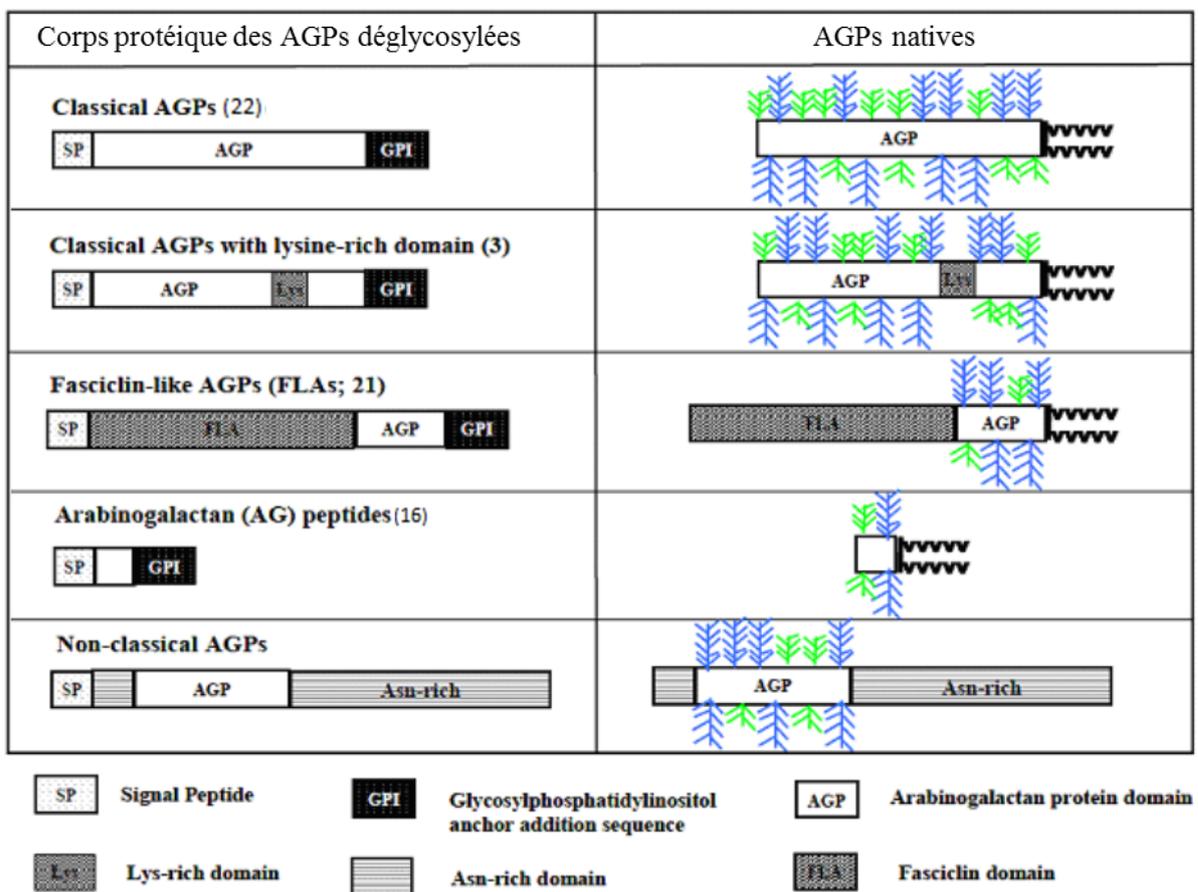


Figure 8 : Structure schématique des différentes classes d'AGPs déglycosylées et natives chez *Arabidopsis thaliana* (Schultz et al., 2002 ;Schowalter et al., 2010)

Des analyses bioinformatiques similaires à celles réalisées chez *Arabidopsis* ont permis d'identifier 69 AGPs chez le riz dont 13 AGPs classiques, 3 AGPs non classiques, 13 AGPs

ENDOL (early nodulin-like), 27 AGPs à domaine fascicline, 15 AG peptides, et 8 AGPs NSLTP-like (non-specific lipid transfer protein-like) (Ma et Zhao, 2010).

Les AGPs classiques possèdent une partie N-terminale hydrophobe, une partie centrale riche en alanine, glycine, sérine, thréonine, hydroxyproline/proline, lieu de la O-glycosylation, et une partie C-terminale également hydrophobe constituant une hélice. Elle est impliquée dans l'addition d'une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI).

Les AGPs non classiques diffèrent des AGPs classiques par la composition du corps protéique constitué de plusieurs motifs riches en cystéine, aspartate, lysine, hydroxyproline/proline et par l'absence d'une extrémité C-terminale hydrophobe. Elles ont en commun la présence d'un peptide signal à l'extrémité N-terminal, mais ne sont pas susceptibles d'avoir une ancre GPI (Schowalter et al., 2001).

Les AGPs riches en lysine sont des sous classes d'AGPs classiques qui comportent dans leur partie centrale une région riche en lysine d'environ 12 acides aminés (Gilson et al., 2001). Trois AGPs riches en lysine ont été identifiées chez *Arabidopsis*. C'est le groupe d'AGPs le plus étudié chez *Arabidopsis* : AtAGP17 (Gaspar et al., 2004), AtAGP18 (Zhang et al., 2011), AtAGPs 19 (Yang et al., 2011). Des AGPs homologues ont été identifiées chez d'autres plantes telles que la tomate, le tabac et le concombre.

Les AGPs à domaine fascicline sont une sous classe des AGPs présentant toutes les caractéristiques des AGPs classiques. Elles possèdent en plus un domaine fascicline. Ce domaine est caractérisé chez *A. thaliana* par deux séquences conservées et la présence des résidus leucine et isoleucine aux alentours du domaine fascicline (Johnson et al., 2003).

Les AG peptides sont des AGPs de petite taille (10 à 13 acides aminés) (Schultz et al., 2004), riches en proline et qui possèdent toutes les caractéristiques des AGPs classiques.

IV.1.2. Structure de la partie glucidique

La partie polysaccharidique de ces glycoprotéines, représentant 90 à 98% de la masse moléculaire. Elle est fixée à la partie peptidique par des liaisons covalentes. Elle est constituée en majorité de résidus galactose et arabinose et accessoirement de rhamnose, de mannose, de xylose, de glucose, de glucosamine, d'acide glucuronique, et d'acide D-galacturonique (Nothnagel, 1997; Showalter, 2001). Bien les AGPs soient généralement uniquement O-glycosylées, il en existe qui possède à la fois une O- et une N-glycosylation.

Les AGPs sont O-glycosylés sur l'hydroxyproline (Schultz et al., 2000) par un nombre variable de chaînes d'AG de type II à l'origine de l'hétérogénéité des masses moléculaires observées. Les chaînes d'arabinogalactanes ne sont ajoutées que lorsque les résidus d'hydroxyproline sont non contigus et inversement les arabinosyles sont ajoutés uniquement sur des résidus contigus d'hydroxyproline (Kieliszewski et Shpak, 2001).

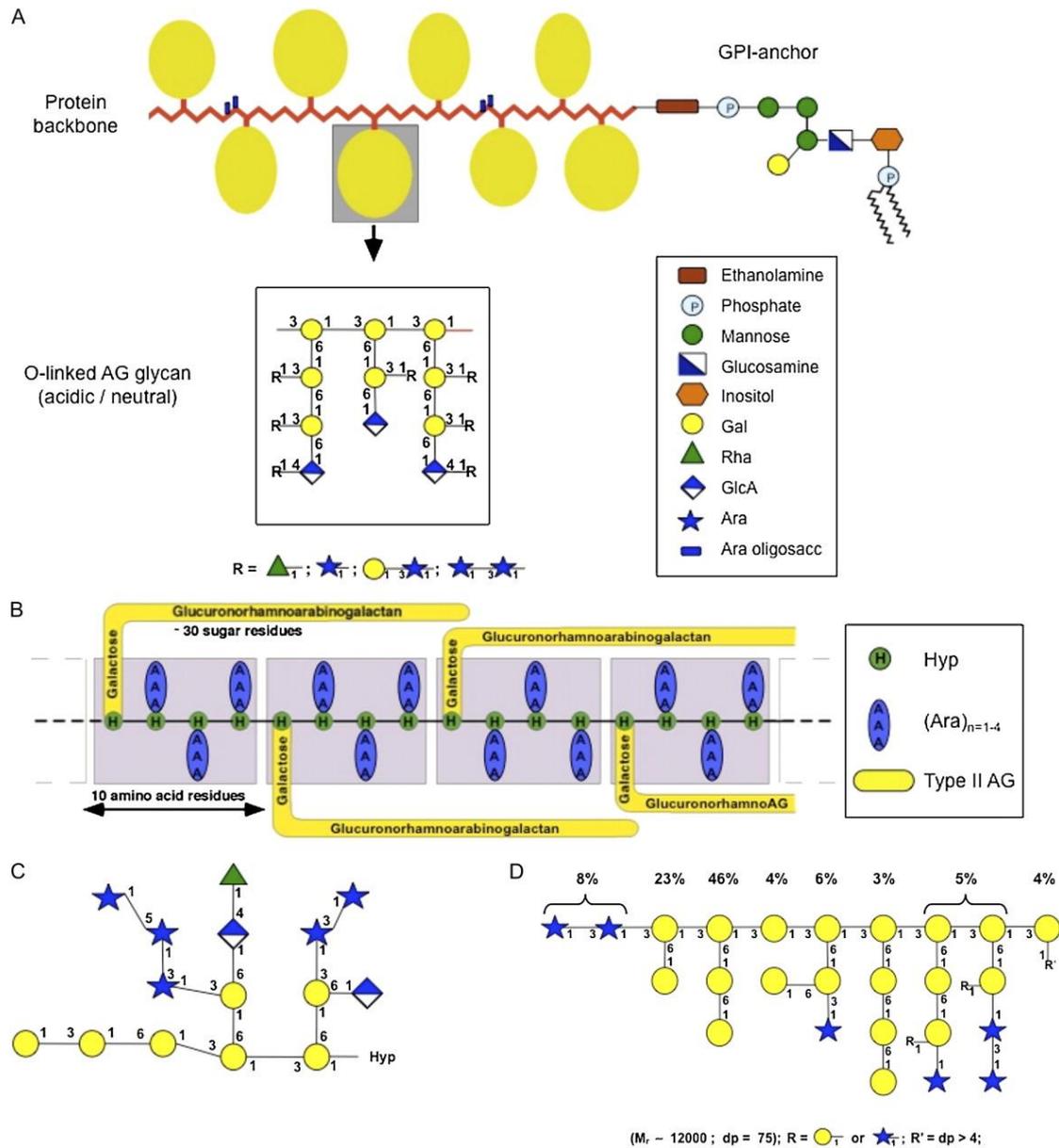


Figure 9 : Représentation schématique de la diversité de la structure glycannique des AGPs. (Ellis et al., 2010)
 A Le modèle Wattle blossom des AGPs avec une ancre GPI ; B Le modèle twisted hairy rope de l'AGP de la gomme arabique; C structure de polysaccharide de type AG; D Structure de l'AGP du Mélèze ; GPI glycosylphosphatidylinositol

Source : <http://www.plantphysiol.org/content/153/2/403/F1.large.jpg>

IV.2. Maturation des AGPs

Les AGPs subissent après la traduction, des modifications importantes qui définissent leur structure et leurs fonctions (Fig. 10).

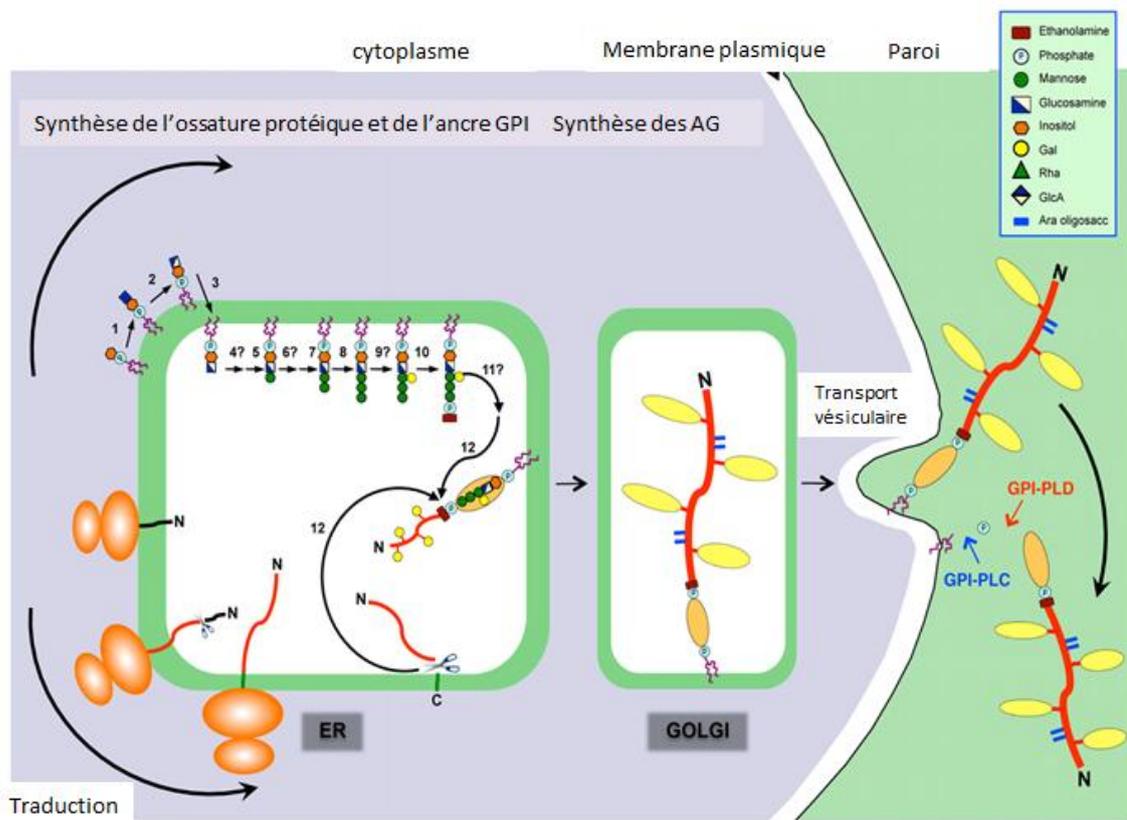


Figure 10 : Synthèse et maturation des AGPs (Ellis et al. 2010). ER.réticulum endoplasmique ; Golgi, appareil de Golgi

IV.2.1. L'hydroxylation de la proline

Les résidus prolines sont hydroxylés dans le réticulum endoplasmique (Fig.10) par une enzyme tétramérique, la propyl-4-hydroxylase pour former l'hydroxyproline. Cette hydroxylation est essentielle pour les glycosylations futures. Elle concerne plus de 80 % de résidus proline (Kieliszewski et al. 1994; Sommer-Knudsen et al., 1998). Les résidus hydroxyprolines associés aux acides aminés alanine, proline, valine, sérine sont préférentiellement associés à un arabinose, alors que les autres sont O-glycosylés par un galactose pour former les arabinogalactanes des AGPs (Kieliszewski and Lamport, 1994; Kieliszewski et al., 1995; Tan et al., 2003).

IV.2.2. La glycosylation

L'étude de la biosynthèse des protéoglycanes des mammifères et les travaux de Strasser et al. (2007) et Qu et al. (2008) montrent que les arabinogalactanes (AGs) des AGPs sont synthétisés par les glycosyltransférases (GT) de type II, localisées dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Ce sont les GT qui possèdent une activité 1,3- β -galactosyltransférase (Egelund et al., 2010). La O-glycosylation de l'hydroxyproline se déroule de deux manières distinctes: l'arabinylation et la galactosylation. L'arabinylation, qui est propre à toutes les glycoprotéines riches en hydroxyproline, consiste en la substitution d'une courte chaîne (1 à 4 résidus) linéaire et neutre d'homo-oligosaccharides d'arabinose.

La galactosylation résulte d'un ajout d'une longue chaîne hétéro polysaccharidique d'arabinogalactanes. La O-galactosyltransférase, enzyme d'initiation de la biosynthèse des AGs, fixe le premier résidu galactose au résidu hydroxyproline de l'ossature protéique. Elle est localisée dans le réticulum endoplasmique (Oka et al., 2010).

IV.2.3. L'ancrage GPI

Ce processus fait partie de l'étape de la maturation des AGPs. La partie non protéique se complexe au résidu peptidique. Les glycosylphosphatidylinositol ont une structure de base commune EtNP-6Man α 1-2Man α 1-6Man α 1-4GlcN α 1-6 myo inositol –phospholipides, qui est conservée chez toutes les espèces (Kinoshita et al., 2008; Orlean et Menon, 2007). Il existe une variabilité dans les chaînes latérales et les fragments lipidiques d'ancres GPI liée à la nature des protéines et à l'espèce. L'addition de cette ancre est possible grâce à l'existence de trois domaines: un domaine de 3 acides aminés aliphatiques consécutifs nommés respectivement w, w+1, w+2, suivi d'une courte région basique le «spacer» de 4 à 8 acides aminés et d'un domaine C-terminal hydrophobe constitué de 14 à 18 acides aminés. Le site de d'ancrage a lieu sur le domaine w.

IV.3. Analyse et caractérisation des AGPs

La complexité de structure des AGPs rend leur analyse difficile. Pour étudier la fonction et la localisation de ces molécules, des outils expérimentaux spécifiques sont utilisés.

IV.3.1. Sondes d'analyse

Le réactif de Yariv. L'étude des AGPs a été rendue possible grâce à la synthèse du réactif de Yariv (Yariv, 1962). Il existe plusieurs réactif de yariv encore appelé glycosyl Yariv. On distingue le α -D galactosyl Yariv, le β -D mannosyl et α -D mannosyl Yarivet le β -D glucosyl Yariv. Seul le β -D glucosyl Yariv possède la capacité de se lier spécifiquement aux AGPs pour former un complexe rouge- orange. Les interactions Yariv-AGPs restent encore mal connues.

Les anticorps. De nombreux anticorps dirigés contre certains épitopes des AGPs sont commercialisés. Ils peuvent être polyclonaux ou monoclonaux et réagissent soit avec la partie glucidique soit avec la partie protéique (Tableau 1).

Tableau 1 : Quelques anticorps dirigés contre les AGPs.

Anticorps	Fraction	Epitopes	Auteurs
LM2	Glucidique	Résidu β -D glucoronopyranosyl	Smallwood et al., 1996
JIM 4 et JIM 13	Glucidique	β -D-Glcp-(1-3)- α -D-GalpA-(1-2)-L-Rha	Yates et al., 1996 ; Pennell et al., 1989
MAC207	Glucidique	β -D-Glcp-(1-3)- α -D-GalpA-(1-2)-L-Rha des AGPs membranaires	Yates et al., 1996 ;
CCRC-M7	Glucidique	(1-6)- β -D-Galactane arabinosylé	Steffan et al., 1995
JIM 14	Glucidique	-	Knox et al., 1991
JIM 8	Glucidique	-	Pennell et al., 1991
Anticorps PAP	protéique	PAPAPSKGKVKGKKGKHHNA	Gao et al., 1999
LeAGP1	Protéique	Résidu de 15 acides aminés riches en Lys	Gao et al., 1999
AtAGP 17	Protéique	PALTKKKKKTKKHKTAP	Gaspar et al., 2001

IV.3.2. Techniques d'analyses

Plusieurs techniques sont utilisées pour analyser les AGPs. Les techniques de biologie cellulaire et de biochimie, les techniques moléculaires et génétiques, la bio informatique, (Tan et al., 2012).

Des techniques histologique et biochimique permettent de détecter les AGPs. Elles sont localisées dans les tissus et cellules végétales à l'aide du réactif de β -glucosyl-Yariv et avec des anticorps par marquages, immunofluorescent ou à l'or. Les AGPs détectées sont quantifiées dans les extraits tissulaires à l'aide du réactif de β -glucosyl-Yariv. Ce réactif de Yariv, et les anticorps monoclonaux, se lient à 50 à 100 AGPs différentes et fournissent ainsi une vue globale sur leur distribution, leur localisation et leur fonction éventuelle.

La bio informatique a révolutionné l'étude des AGPs et permet avec la génomique une analyse plus fine et une classification plus précise des AGPs (Showalter et al., 2010, Ma et Zhao, 2010). La purification des AGPs individuelles restent toutefois une difficulté non résolue.

IV.4. Lieu d'expression

Les AGPs sont présentes chez toutes les espèces végétales (Nothnangel, 1997; Fincher, 1983). Leur localisation est cependant difficile à établir du fait de leur grande solubilité (Showalter, 1993). Au niveau des organes on les trouve à la fois dans les racines, les tiges, les feuilles et les embryons (Van Hengel et Roberts, 2003); elles sont aussi présentes dans les grains de pollen et le tube pollinique (Coimbra et al., 2009), la partie florale (Acosta-Garcia et Vielle-Calzada, 2004.), le xylème (Motosé et al., 2004) et le style (Gane et al., 1995). Au niveau cellulaire, on les retrouve dans la membrane plasmique, la paroi et l'espace intercellulaire (Nothnangel, 1997; Knox et al., 1991). On les détecte également dans l'espace intracellulaire, dans les vésicules et les vacuoles (Hermann et Lamb, 1992; Schindler et al., 1995). L'utilisation de l'hydroxyproline marquée dans les suspensions cellulaires de *Phaseolus vulgaris* a permis de mesurer au bout de 5 min une radioactivité dans les AGPs sécrétées dans le milieu de culture (Van holst et al., 1981). Ces essais ont également montré que la demi vie des AGPs est d'environ 15 min d'où l'intérêt de leur stockage dans les vésicules et la vacuole (Hermann et Lamb, 1992; Pennell et al., 1992).

IV.5. Mode d'action

Le mécanisme d'action des AGPS est encore mal connu, principalement en raison des difficultés posées par les chaînes saccharidiques complexes. Cependant, la structure complexe de la fraction saccharidique indique une fonction dans la signalisation. Les AGPs possèdent un large éventail d'informations biochimiques et seraient vraisemblablement impliquées dans les

interactions avec d'autres molécules de la surface cellulaire (Schultz et al., 1998). Les AGPs peuvent interagir avec les pectines et avec les glucosides flavonol produits dans les plantes.

De nombreuses hypothèses ont été faites sur le mode d'action des AGPs et cinq modèles (Fig.11) ont été proposés par Showalter (2001).

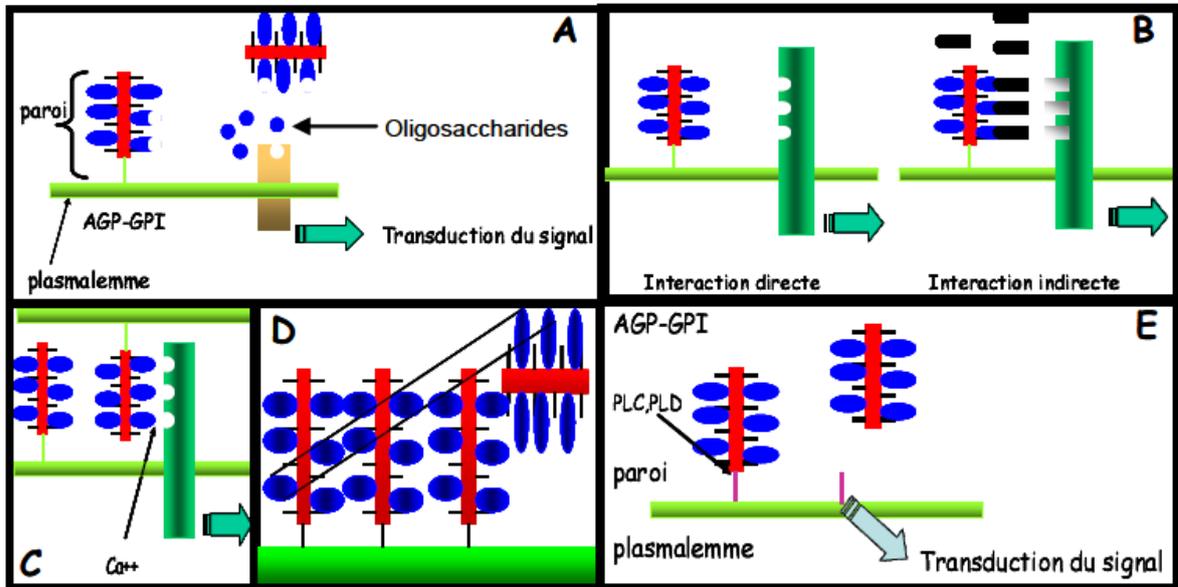


Figure 11 : Modélisation du mécanisme d'action des AGPs (Showalter, 2001 ; Hijazi, 2011).

(A) Les AGPs libèrent sous l'action des enzymes, des oligosaccharides et des monosaccharides activateurs des récepteurs membranaires. Il a été montré que les résidus N-acetylglucosamine, libérés sous l'action de la chitinase, participent à l'initiation de l'embryogenèse somatique chez la carotte (Van Hengel et al., 2001).

(B) Les AGPs agissent sur les récepteurs de la membrane plasmique. Ce modèle correspond à celui décrit par Zhang et al., (2011) pour expliquer le fonctionnement de l'AtAGP18 chez *Arabidopsis thaliana* dans la signalisation cellulaire qui contrôle la croissance et le développement de la plante.

De façon directe, les AGPs se lient aux récepteurs impliqués dans les signaux de transduction

De façon indirecte, les AGPs se lient à des ligands divers et les transfèrent à des récepteurs spécifiques. C'est le cas de l'héparine (glycoprotéine sulfatée) chez les animaux qui piège les FGF (Fibroblast Growth Factors) pour les transférer à leurs récepteurs (Schlessinger et al., 1995).

(C) Les AGPs assurent la communication intercellulaire. Les AGPs peuvent se lier à des récepteurs des cellules voisines sans contact entre cellules. Elles agiraient par des perturbations de la membrane et l'ouverture des canaux calciques (Baldwin et al., 1993). Toutefois, la capacité de transduction du signal n'est pas bien établie.

(D) Les AGPs sont acteurs de l'adhésion des cellules nécessaires à la croissance et au développement

(E) Les AGP-GPIs sont la cible de plusieurs systèmes enzymatiques tels que les phospholipases C ou D, dont l'action libère des phosphatidyl inositols, des céramides connus comme messagers intercellulaires (Munnik et al., 1998).

IV.6. Importance socio économique des AGPs

Les AGPs ont été mis en évidence pour la première fois dans la gomme arabique. Elles sont utilisées dans le domaine industriel comme émulsifiants, adhésifs et stabilisateurs de l'eau. Les AGPs du mélèze et de la gomme arabique (exsudat des Acacia) sont les plus commercialisées (Showalter, 2001).

Les AGPs et les AG de type II ont également un potentiel médical. Elles stimulent le système immunitaire chez les animaux (Showalter, 2001; Pettolino, 2006). Dans le domaine pharmaceutique elles sont utilisées comme absorbant de graisse, dans le traitement du diabète, et dans l'enrobage des médicaments (Ozaki et Kitamura, 2005; Malainine, 2007).

IV.7. Fonction biologique des AGPs

Les AGPs sont présentes dans tout le règne végétal (Clarke et al., 1979; Fincher et al., 1983). La persistance de ces protéines au cours de l'évolution est une preuve de leur importance chez les végétaux. Certaines AGPs sont spécifiques à un tissu, un organe ou un stade de développement (Schinder et al., 1995). Elles sont impliquées dans les processus de croissance, de développement et d'adaptation tels que: la formation des racines (Knox et al., 1989 ; 1992), la division cellulaire (Serpe et Nothnagel, 1994); la croissance du tube pollinique (Mollet et al., 2002); l'expansion cellulaire (Lee et al., 2005) ; la différenciation cellulaire (Motosé et al., 2001) et la mort cellulaire programmée des cellules (Gao et al., 1999). Ces protéoglycanes participent également à l'épaississement de la paroi secondaire (Gao et al., 2000; Chavez et al., 2008; Lafarguette et al., 2004), à la tolérance au sel (Lamport et al., 2006) et à l'auto incompatibilité pollinique (Lee et al., 2008; Hannock et al., 2005); il faut ajouter la

différenciation du xylème (Motose et al., 2004), la plasticité de la paroi cellulaire (Lamport et al., 2006) et l'embryogenèse somatique (Windels, 2005 ; Poon et al., 2012). Un nouveau rôle dans les interactions root-microbes a été mis en évidence dans le contrôle de l'infection précoce des racines de *Pisum sativum* et *Brassica napus* (Cannesan et al., 2012) . L'apport exogène des AGPs dans le milieu de culture augmente le potentiel embryogène des suspensions cellulaires, (Kreuger et al., 1995; Toonen et al., 1997).

IV.8. Implication des AGPs au cours de l'embryogenèse

Les AGPs sont des protéoglycans utilisées dans l'amélioration de la production d'embryons somatiques chez la carotte, le cyclamen ou le chou blanc (Kreuger et al., 1995; Toonen et al., 1997, Yuan et al., 2012). Une concentration de 15 µg/ml d'AGPs augmenterait de 40 fois la production d'embryons somatiques des souches mutantes non embryogènes de carotte (Van Hengel et al., 2001). Si les AGPs favorisent l'embryogenèse somatique, leur implication dans l'embryogenèse zygotique a été démontrée.

L'étude des AGPs chez *Nicotiana tabacum* L., et *Arabidopsis thaliana* a mis en évidence leur implication dans la division cellulaire aux stades précoces de l'embryogenèse zygotique (Qin et Zhao, 2006, Hu et al., 2006, Yu et Zhao, 2012). Elles seraient également impliquées dans la différenciation des embryons aux derniers stades de développement des embryons zygotiques (Šamaj et al., 2005). Leur rôle dans la reproduction sexuée des plantes est bien établi. La dégradation des AGPs maternelles survient après la fécondation, tandis que la cellularisation de l'albumen conduit à une nouvelle série d'AGPs (Van Hengel et al., 2002).

Ces protéines O-glycosylées ont été révélées comme marqueurs du potentiel embryogène cellulaire. Les AGPs sont détectés dans la matrice extracellulaire des cellules embryogènes (Šamaj et al., 2008). Elles sont présentes dans les tissus embryogènes et absentes dans les tissus non embryogènes (Portillo et al., 2012). La purification des AGPs de ces tissus met en évidence la différence sur le plan biochimique des AGPs des tissus embryogènes et non embryogènes. Chez le coton, la fraction hydrophobe des AGPs des cals embryogènes activerait l'embryogenèse somatique contrairement aux AGPs des cals non embryogènes. L'expression des AGPs est régulée au cours du développement des embryons (Lucau-daniella et al., 2010, Pan et al., 2011).

V. PROBLEMATIQUE

L'embryogenèse somatique est une technique de multiplication végétative qui permet d'obtenir de nombreux embryons identiques à la plante mère à partir d'un tissu non sexuel. Chez le cacaoyer elle permet d'assurer la production des clones pour contourner les problèmes liés à l'allogamie et à la dichogamie de la plante. Les embryons somatiques germent en plantes entières avec une racine pivotante qu'on n'obtient pas par bouturage. Plusieurs travaux de recherches ont été réalisés dans le but d'améliorer, et de maîtriser, cette technique chez cette espèce. Cependant, le développement des embryons somatiques reste toujours fonction du génotype et leur conversion en plante serait dépendante de facteurs endogènes.

Les phénomènes de dédifférenciation et de redifférenciation, donnant lieu à la formation des embryons somatiques, sont accompagnés de profondes modifications de la paroi. La paroi occupe donc une place de première importance dans l'organisation embryonnaire. Elle intervient dans la mise en place de la polarité, indispensable à la configuration initiale de l'embryon (Baluska et al., 1997). La paroi primaire, présente dans les embryons, est constituée non seulement de polysaccharides et de protéines mais aussi de glycoprotéines dont les arabinogalactanes protéines (AGPs). Les AGPs, détectées chez de nombreuses espèces végétales, assureraient un rôle dans la croissance et le développement. Des travaux menés, en particulier, chez la carotte (Van Hengel et al., 2002), la chicorée (Chapman et al., 2000) et le chou blanc (Yang et al., 2012) montrent que certains types d'AGPs pourraient induire ou favoriser le développement des embryons somatiques.

Chez le cacaoyer, aucune analyse d'AGPs n'avait encore fait l'objet de publication au départ de cette étude. C'est une des raisons pour laquelle l'analyse de ces macromolécules, constitutives des embryons, a été entreprise. Le but étant d'identifier les AGPs qui pourraient favoriser le développement des embryons chez cette espèce. Une perspective à plus long terme est celle de pouvoir utiliser ces molécules pour maximiser la production d'embryons somatiques chez toutes les variétés de cacaoyers cultivées.

VI. OBJECTIFS

L'objectif poursuivi dans le cadre de cette thèse est établi sur la base d'une approche fondamentale pour soutenir une approche appliquée. Il s'agit de définir l'implication des AGPs dans le développement des embryons de cacao afin de promouvoir l'amélioration de la production des embryons somatiques de cette plante.

Dans une première partie, nous nous sommes proposés de définir les critères permettant de prélever et de comparer les embryons zygotiques et somatiques. L'identification des stades sera réalisée à l'aide des critères morphologiques et les différences seront étudiées sur le plan histologique et protéomique.

Dans une seconde partie, nous avons décidé d'étudier l'évolution du glycoprotéome du patron d'expression des AGPs au cours de l'embryogenèse de *T. cacao* pour le clone SNK 630.

Dans une troisième partie nous avons voulu identifier et purifier les AGPs à l'aide du β -D-glucosyl Yariv puis les séparer par chromatographie à haute performance. La polarité et la masse moléculaire seront utilisées comme critères de séparation pour analyser les différentes fractions d'AGPs.

Enfin nous avons envisagé de mettre au point une technique de détection des AGPs après chromatographie afin de suivre leur évolution au cours du développement dans les embryons zygotiques et somatiques.

***PARTIE B. MATERIEL ET
METHODES***

I. MATERIEL BIOLOGIQUE

Le matériel végétal utilisé est prélevé au Cameroun sur des cacaoyers du champ expérimental de l'Institut de Recherche Agricole pour le Développement (IRAD) de Yaoundé (Nkolbisson). Trois génotypes différents de cacaoyer sont choisis en fonction de leur degré d'embryogénie observé au cours des travaux préliminaires au laboratoire.

Sca 6, très embryogène, appartenant au groupe des Forastero, est un génotype à haut rendement (Pang, 2006), sensible à la pourriture brune.

SNK 630, génotype embryogène, fait partie du groupe des Trinitario, il est tolérant à la pourriture brune.

ICS 60 de la famille des Trinitario est très peu embryogène. C'est un génotype sensible à la pourriture brune.

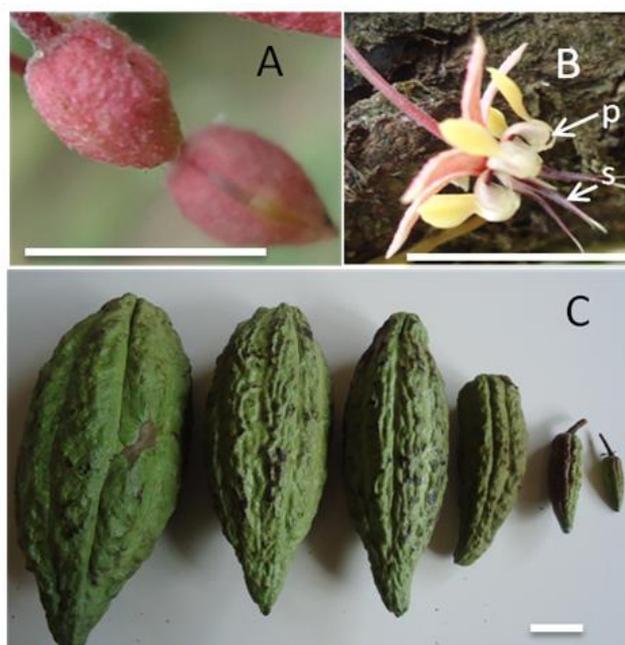


Figure 12 : Fleurs et fruits du cacaoyer (*Theobroma cacao*) Boutons floraux (A). Fleur ouverte du génotype SNK 630 présentant les staminodes (s) et les pétales (p) (B). Cabosses et chérelles (cabosses juvéniles) du génotype ICS 60 (C). Trait = 1cm.

Les cabosses de ces différents génotypes sont prélevées à différents stades de développement pour l'étude de l'embryogenèse zygotique (Fig. 12 C). Les boutons floraux immatures (Fig. 12 A) sont prélevés sur les mêmes pieds de cacaoyer pour initier l'embryogenèse somatique.

II. CONDITIONS DE PRELEVEMENT ET DE CULTURE

II.1. Obtention des embryons zygotiques et de l'albumen

Les embryons zygotiques et l'albumen sont prélevés séparément après la récolte des cabosses. Les chérelles (cabosses juvéniles) et les cabosses sont disséquées à l'aide d'un couteau et les fèves à l'aide d'une lame de scalpel, sous une loupe. Le matériel destiné à l'analyse biochimique est stocké à -80°C et celui destiné à l'analyse histologique est maintenu à 4°C avant d'être introduits dans la solution de fixation.

II.2. Production des embryons somatiques

La production des embryons somatiques se fait en utilisant des techniques classiques (Maximova et al., 2002; Minyaka et al., 2008; Niemenak et al., 2008).

II.2.1. Embryons somatiques primaires

Les cultures d'embryons somatiques sont initiées à partir de boutons floraux immatures de cacaoyers des différents clones, récoltés avant le lever du soleil, car le lever du soleil favorise les fissures parfois invisibles et les contaminations. Les boutons floraux de taille moyenne (2 à 3 mm) sont prélevés et transportés dans des tubes contenant de l'eau à 4°C. Ces boutons floraux récoltés sont lavés à l'eau stérile. Ils sont ensuite aseptisés par immersion dans une solution d'hypochlorite de calcium à 1 % (p/v) pendant 20 min, puis, sont rincés à l'eau distillée stérile 3 fois avant d'être disséqués sous une hotte à flux laminaire. Les staminodes et la base des pétales

(Fig. 12 B) sont isolés et mis en culture sur le milieu d'induction de cals PCG (Primary Callus Growth Medium, annexe 1). Après 14 jours, les cultures sont transférées sur le second milieu, le milieu de développement des cals (Secondary Callus Growth Medium, annexe 1). Les embryons obtenus sont ensuite placés sur un troisième milieu après 14 jours, le milieu de développement (Embryo Development Medium). Le renouvellement du milieu s'effectue alors tous les 21 jours pendant 8 mois. Les embryons formés sont des embryons primaires, qui sont prélevés en fonction de leur stade de développement, selon les critères que nous avons définis.

II.2.2. Embryons somatiques secondaires sur milieu solide

Les cotylédons d'embryons somatiques primaires, suffisamment développés et ayant accumulés des anthocyanes, sont utilisés comme explants pour la production d'embryons secondaires. Les cotylédons sont finement sectionnés (4mm^2) et placés sur le milieu SCG 2 (annexe 1), décrit par Maximova et al. (2002). Les cals formés au bout de deux semaines sont transférés sur un milieu de développement des embryons (ED) et ce milieu est changé toutes les 3 semaines. Les embryons formés sont prélevés suivant le même principe que les embryons somatiques primaires.

II.2.3. Embryons somatiques secondaires sur milieu liquide

La croissance de ces embryons est assurée par un dispositif d'immersion temporaire qui est constitué par le RITA (Récipient d'Immersion Temporaire Automatique). Il s'agit d'un récipient (Fig. 13 A) contenant une cloche, protégeant le milieu de culture, associée, par un cylindre central, à un panier assurant le passage de l'air. Les cals sont posés sur un tamis placé dans le panier (Fig. 13 A).

Le flux d'air envoyé par une pompe à travers un tuyau qui la relie au récipient, refoule le milieu qui remonte de part et d'autre de la cloche et immerge les cals en traversant les mailles du panier et du tamis. L'automatisme du système est assuré par un minuteur programmable qui fait fonctionner la pompe pendant 1min toutes les six heures. Ce dispositif est utilisé pour accroître le facteur de multiplication des embryons somatiques secondaires. Les cals ayant séjourné trois semaines sur le milieu ED solide sont transférés dans le RITA contenant du milieu ED liquide (Fig. 13 B). Les cultures sont immergées (Fig. 13 C) pendant 1 min, toutes les 6 heures, et le milieu est renouvelé toutes les 3 semaines. Le milieu prélevé lors du transfert est filtré, puis stocké à -20°C . Les embryons sont prélevés en fonction de leurs stades de développement, et stockés à -80°C .

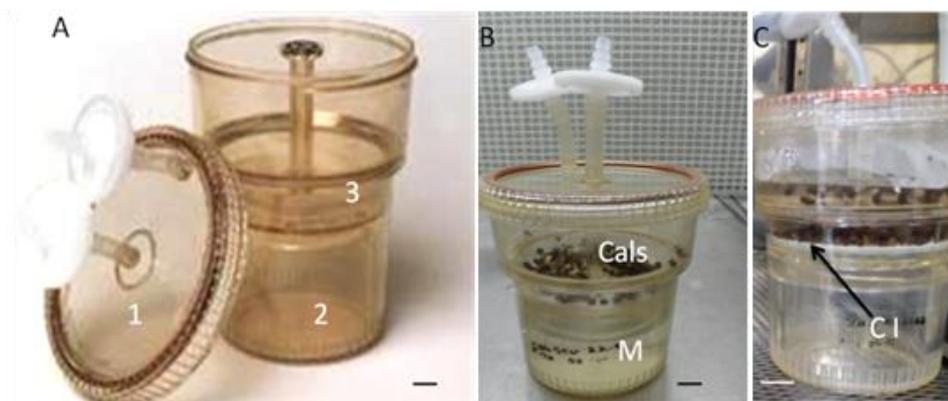


Figure 13 : Description du récipient d'immersion temporaire automatique. Le RITA est constitué d'une cloche (A2) qui protège le milieu (M), d'un panier dans lequel sont déposés les cals et d'un couvercle (A1) ; sous la pression de l'air le milieu remonte dans le panier et les cals sont immergés (CI).

III. SYNTHÈSE DU B-D-GLUCOSYL YARIV

La synthèse du réactif de Yariv, 1,3,5-tris-(4-β-D-Glucopyranosyloxyphénylazo)-2,4,6-trihydroxy-benzène, s'effectue en cinq étapes suivant le protocole de Basile et Ganjian (2004). Elle débute par la préparation de la solution A entre 0 et 4°C. L'acide chlorhydrique 0,5 M (9 mL) est ajouté à $1,5 \cdot 10^{-3}$ mol de 4-aminophényl β-D-glucopyranoside (Sigma) sous agitation jusqu'à dissolution complète. La solution B, correspondant à $1,5 \cdot 10^{-3}$ mol de NaNO₂ (Sigma) dans 5 mL d'eau ultra pure, est mise à refroidir à 4°C. Elle est ensuite ajoutée à la solution A pendant 5 min à 4°C. A la fin de la réaction, une solution claire de sel, le diazonium-phényl-β-D-glucoside, est obtenue. La solution C est alors préparée à l'aide de 0,375 mmol de phloroglucinol (Sigma) dans 25 mL d'eau ultra pure, et refroidie dans de la glace. Enfin, la solution C est ajoutée goutte à goutte au mélange (A+B) à 4°C. Le mélange obtenu, orangé, est laissé 30 min à 4°C, avant de laisser remonter la température en contrôlant le pH de la solution. Ce dernier est ajusté à 9 en ajoutant goutte à goutte une solution de NaOH 0,5 M. Après stabilisation du pH à 9, le β-glucosyl Yariv est précipité la nuit dans l'éthanol absolu à 4°C, puis filtré sur fritté.

IV. EXTRACTION ET PURIFICATION DES AGPs

IV.1. Extraction des protéines

Une mise au point a été effectuée sur la technique de broyage et sur le tampon d'extraction et les résultats sont utilisés pour l'extraction des AGPs. Le matériel biologique, 500 mg, est broyé dans l'azote liquide, puis repris 500 µl de tampon HEPES [HEPES 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Acide ascorbique 300 mM, β-mercaptoéthanol 2% (v/v), Triton X 100 0,8% (v/v)]. Après 30 min d'incubation à -20°C, le mélange obtenu est centrifugé, pendant 10 min, à 4°C, et à 14 000g. Le surnageant constitue alors l'extrait brut, qui est stocké à -20°C.

IV.2. Extraction et purification des AGPs

Les AGPs sont extraites suivant le protocole de Schultz et al. (2000). Cinq grammes de matière fraîche sont finement broyés dans l'azote liquide, puis repris dans 5 mL de tampon d'extraction [Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 EDTA 10 mM, β-mercaptoéthanol 0,1% (v/v), Triton X-100 0,1%(v/v)]. Après 3 heures d'incubation à 4°C, le culot est séparé du surnageant par centrifugation à 14 000g, pendant 10 min. Les AGPs sont alors précipitées par 5 volumes d'éthanol absolu, pendant une nuit, à 4°C. Le mélange est centrifugé pendant 10 min à 14000g, le culot ainsi obtenu est mis en suspension dans 5 mL de Tampon Tris-HCl 50 mM à pH 8,0. La solution est centrifugée à 14000g, pendant 10 min, à 4°C. Le culot obtenu est re-suspendu, puis centrifugé comme décrit précédemment. Les surnageants sont additionnés, congelés et lyophilisés. Le lyophilisat est repris dans 1ml de NaCl 1% (p/v) et additionné à un volume égal d'une solution de β-glucosyl Yariv préparée à 2 mg.mL⁻¹ dans du NaCl 1%. Après 24 h à 4°C, les AGPs non complexées sont séparées par centrifugation pendant 1h, à 14000g. Le complexe insoluble AGPs/β-glucosyl Yariv est lavé trois fois avec du NaCl 1% et deux fois avec du méthanol pour enlever l'excès de Yariv. Le précipité est ensuite séché et dissous dans 250 µL de diméthyl sulfoxyde (DMSO) qui permet de solubiliser les AGPs. Une pincée de dithionite de

sodium solide est ajoutée ainsi que 1ml d'eau ultra pure. Le mélange est vortexé jusqu'à l'obtention d'un mélange jaune clair qui est dessalé sur colonne de sephadex G 25.

V. ANALYSES HISTOLOGIQUES

V.1. Protocoles de Fixation-Inclusion

V.1.1. Fixation-Inclusion dans le LRW (London Resin White)

Les échantillons prélevés sont fixés dans une solution préparée extemporanément (Tampon phosphate 50 mM pH 7,2, paraformaldéhyde 2%, caféine 1%, glutaraldéhyde 1%). Cette solution permet d'immobiliser les molécules *in situ* pour préserver la structure des tissus. La fixation à l'obscurité dure 1 nuit à 4°C. La fixation est suivie de 6 lavages de 10 min chacun dans le tampon phosphate 50 mM pH 7,2 contenant 7,5% de saccharose. La déshydratation se fait dans des bains d'éthanol de concentration croissante (10%, 30%, 50%, 70%, 90%, 2X 100%) de 20 min chacun. Immédiatement après, les échantillons sont imprégnés dans la résine LR White Medium (No 18181TED PELLA. INC., USA), selon le protocole suivant :

1er et 2ème bains de 30 min à 4°C: 33% LR White dans l'éthanol absolu

3ème et 4ème bains de 20 min à 4°C: 66% LR White dans de l'éthanol absolu.

5ème, 6ème bains de 2 x 1 h et un 7ème de 1 nuit à 4°C: 100% LR White.

Les embryons sont ensuite introduits dans des gélules contenant de la résine pure, et la polymérisation se déroule en étuve, à 56°C pendant 24 h.

V.1.2. Fixation-inclusion dans la paraffine

Les embryons prélevés sont fixés dans une solution de PBS 0,01 M pH 7,4 contenant du paraformaldéhyde à 2%, plus de la caféine à 1% et du glutaraldéhyde à 1%. La fixation est suivie de six lavages successifs dans le PBS 0,01 M pH 7,4. La déshydratation des échantillons se fait progressivement dans des bains d'éthanol de concentration croissante (10%, 30%, 50%, 70%,

90%, 2X 100%) d'une heure chacun. Cette étape est suivie de 3 bains de 3h dans l'isopropanol puis de 3 bains dans un mélange paraffine/isopropanol 1/3 (v/v), puis 1/1 (v/v), puis 2/1 (v/v), et enfin par 3 bains dans la paraffine pure (Histowax) de 4 h chacun. Les échantillons sont ensuite inclus dans des moules et placés à 4°C pour la polymérisation.

V.2. Obtention des sections semi-fines et ultra-fines des échantillons

V.2.1. Section du matériel inclus en LRWhite

Les coupes semi-fines (1-2 µm) et ultra-fines (50-100 nm) sont réalisées à l'ultra-microtome (Om U3, Reichert, Autriche) à partir des gélules contenant les échantillons inclus. Les coupes semi-fines sont recueillies dans de l'eau ultra pure puis déposées et séchées sur des lames avant coloration. Les coupes ultra-fines, étalées par des vapeurs de toluène, sont prélevées sur des grilles d'or équipées d'une membrane de Parlodion (Ted Pella, INC., Ref 01810G-F), puis immédiatement stockées à l'abri de l'humidité et de dépôt de poussières. Elles permettront l'observation ultrastructurale des échantillons et des réactions d'immuno-marquage au Microscope Electronique à Transmission (MET).

V.2.2. Section du matériel inclus en Paraffine

Les coupes de 15 à 20 µm d'épaisseur sont réalisées au microtome (Thermoscientific, Shandon Finesse 325). Les coupes recueillies dans de l'eau milli Q à 50°C sont prélevées sur des lames SuperFrost ultra plus (Thermo scientific). Elles sont mises à sécher à l'air libre, puis incubées à 45°C pendant la nuit, avant les colorations ou les réactions d'immuno-marquage.

V.3. Double coloration des glucides et des protéines au PAS-Naphtol

V.3.1. Principe de la double coloration PAS-Naphtol

La coloration à l'acide périodique et au Schiff (Periodic Acid Schiff) met en évidence les glucides, qu'ils soient neutres ou à fonction acide. Un agent oxydant, l'acide périodique, rompt les liaisons entre deux carbones de certains groupements chimiques et fait apparaître des aldéhydes qui forment avec le réactif de Schiff un produit de condensation de couleur rose

fuschia. Le naphthol-bleu-black (4-amino-5-hydroxy-3-[(4-nitrophenyl)azo]-6-(phenylazo)-2,7-Naphthalene disulfonic acid, disodium salt) colore en bleu les protéines. C'est un colorant diazoïque caractérisé par la présence de deux groupements azoïques, reliant les noyaux benzéniques, qui donnent à ce colorant une très grande stabilité.

V.3.2. Coloration PAS-Naphtol

Les coupes de paraffine sont tout d'abord déparaffinées dans du xylène. Puis, elles sont réhydratées et incubées dans le périodate de sodium à 0,8% pendant 5 min. Cette étape de démasquage est suivie de plusieurs rinçages à l'eau courante et à l'eau distillée. Les coupes sont ensuite colorées pendant 20 min au réactif de Schiff. Ce réactif est obtenu en ajoutant 1g de fuschine basique à 1g de métabisulfite de sodium dans 60 mL d'acide chlorhydrique 0,1 M, mélange ramené à 200 mL avec de l'eau ultra pure. Les coupes traitées par ce réactif sont à nouveau rincées plusieurs fois à l'eau ultra pure puis colorées pendant 2 min au bleu naphthol (1g de Naphtol Blue Black dans 7 mL d'acide acétique, complété à 100 mL avec de l'eau ultra pure). Après rinçage dans l'acide acétique à 7% et à l'eau (Fisher, 1968), ces coupes sont réhydratées, séchées à l'air libre et montées entre lames et lamelles grâce à l'eukitt (Fisher), puis observées au microscope optique.

V.4. Observation microscopique de fluorescence

Les coupes déparaffinées et réhydratées sont soumises à des réactions d'immunomarquage avec une révélation en fluorescence. Après ces réactions, elles sont montées entre lame et lamelles dans du glycérol/PBS (v/v). Elles sont observées au microscope à fluorescence (DM4000 B, Leica Microsystems, France) couplé à une caméra pour l'acquisition des images (DFC300FX, Leica Microsystems, France).

V.5. Microscopie électronique à transmission (MET)

Les grilles or membranées portant les coupes après les réactions d'immuno-marquage sont contrastées à l'acétate d'uranyle à 7% dans l'eau pendant 6 min afin d'obtenir une meilleure résolution lors de l'observation des coupes. L'analyse et l'acquisition des images ont été effectuées à l'aide d'un microscope électronique à transmission. Ce travail a été réalisé avec le Jeol 1010, sous 80 Kv, au service d'imagerie (Image Up) de l'Université de Poitiers.

VI. DOSAGES BIOCHIMIQUES

VI.1. Dosage des protéines solubles

VI.1.1. Principe

Les protéines sont dosées suivant la méthode de Bradford (1976), sensible (seuil de détection 2-5 µg de protéines) et rapide. C'est un dosage colorimétrique, basé sur le changement d'absorbance, se manifestant par le changement de la couleur du bleu de Coomassie après liaison (complexation) avec les acides aminés aromatiques (tryptophane, tyrosine et phénylalanine) et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans les protéines. Le bleu de Coomassie réagit avec l'arginine et, dans une moindre mesure, avec l'histidine et la lysine.

VI.1.2. Dosage colorimétrique

Dans des microtubes, le mélange suivant est réalisé: 795 µL d'eau distillée, 5 µL d'extrait protéique et 200 µL de réactif de Bradford (Biorad). Le mélange est homogénéisé, puis laissé 15 minutes à température ambiante. La densité optique est lue au spectrophotomètre à 595 nm. Une gamme étalon est réalisée à partir d'albumine sérique bovine (BSA) à 100 µg/mL pour des quantités de protéines comprises entre 0 et 15µg.

VI.2. Dosage des AGPs par immuno-électrophorèse

VI.2.1. Principe

L'immuno-électrophorèse en fusée en présence du réactif de Yariv est, une méthode d'immuno-diffusion simple, rapide et reproductible, qui permet la détermination de la concentration en AGPs dans un échantillon. Elle consiste à faire migrer une solution d'AGPs, dont on veut déterminer la concentration, dans un gel contenant le réactif de Yariv. Au cours de la migration, les AGPs interagissent avec le β-D glucosyl Yariv soluble pour former un complexe qui se dépose dans le gel. La surface de précipitation est d'autant plus allongée que la quantité d'AGPs déposée dans le puits est observée.

VI.2.2. Electrophorèse en fusée

L'électrophorèse en fusée est réalisée selon le protocole décrit par Ding et Zhu, (1997). Un gel d'1 mm d'épaisseur contenant 1 % d'agarose et 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de β -D-glucosyl de Yariv est préparé. Une gamme étalon est réalisée à partir de la gomme arabique d'acacia (Sigma); 0; 0,125; 0,25; 0,5; 1 mg.mL^{-1} . Huit μL d'extraits dans chaque puits du gel. La migration s'effectue dans un tampon Tris-Glycine (50 mM à pH 8,4, pendant 12 h à (13V.cm^{-1})). Le gel est ensuite rincé dans du NaCl à 2 % avant acquisition de l'image. La hauteur des roquettes formées permet de déterminer la quantité d'AGPs déposée.

VII. ANALYSES CHROMATOGRAPHIQUES

Les AGPs isolés à l'aide du β -D-glucosyl de Yariv sont purifiées et fractionnées à l'aide de différentes chromatographies.

VII.1. Chromatographie d'exclusion Séphadex G25

Il s'agit d'un support utilisé en chromatographie d'exclusion pour dessaler les échantillons. Un volume de 10 mL de gel Séphadex est coulé dans une colonne de 1 cm de diamètre. Il est équilibré avec de l'eau ultra pure à un débit de 10 mL par heure. La chromatographie est ensuite exécutée à ce même débit.

VII.2. Chromatographie liquide à haute performance en phase inverse

C'est une chromatographie qui permet de séparer les composés en fonction de leur polarité. Le chromatographe (Shimazu Lab solution C2 10449) est couplé à un détecteur UV-visible à barrettes diode. La colonne protosyl C-8, 5 μm (250 x 4,6 mm) est équilibrée dans de l'eau

ultra pure avec du TFA à 1% (solvant A) à un débit de 1 mL.min⁻¹ à température ambiante. Ce solvant A est filtré à 0,22 µm avant utilisation. Un volume de 20 µL d'une solution d'AGPs purifiées d'embryons de cacaoyer, repris dans du TFA à 1% est centrifugé, puis injecté. La séparation est réalisée avec 100% du solvant A, pendant 30 min, puis de 30 à 35 min, on augmente jusqu'à 30% d'acétonitrile, TFA 1% (solvant B) et enfin de 36 à 40 min, il augmente jusqu'à 100% d'acétonitrile, TFA 1%.

VII.3. Chromatographie d'exclusion stérique à haute performance

La chromatographie d'exclusion stérique (CES) à haute performance permet de séparer les molécules organiques natives en fonction de leur taille. Le protocole suivi a été décrit par Frølund et al. (1996), Görner et al. (2003), Simon et al. (2009), Bourven et al. (2012). Le chromatographe est composé d'un injecteur d'échantillons automatique, de pompes haute pression, d'une phase stationnaire comportant deux colonnes d'exclusion stérique (Bio sec 3, 300 A° et 100 A°) et deux détecteurs en série. Il s'agit d'un détecteur UV-visible à barrettes de diode (L-7455 Merck HITACHI) et un détecteur de fluorescence (L-7485 Merck HITACHI) de marque lachrom. La phase mobile est constituée de tampon phosphate de sodium 50 mM, à pH 7,0. Avant utilisation, la phase mobile est filtrée à 0,22 µm avec des filtres en nitrate de cellulose, puis dégazée sous vide pendant 20 min. Les échantillons lyophilisés sont dissous dans 1 mL d'eau ultra pure puis filtrés sur membrane de cellulose de 0,22 µm juste avant l'analyse. Le volume d'injection est de 100 µL.

La calibration des colonnes CES est réalisée d'une part par les protéines et d'autres part par les polysaccharides, qui sont les molécules constitutives des AGPs. L'étalon protéique est constitué de Tyroglobulin 670 kDa (Sigma), Ferritine 440 kDa; Immunoglobuline G de sérum humain 155 kDa; Albumine de sérum bovin 69 kDa; Ovalbumine 45 kDa; Ribonucléase a 13,7 kDa; cytochrome C 13 kDa; Glucagon 3,7 kDa; TRH 0,3 kDa et tyrosine 0,18 kDa. Le volume de perméation total est défini par l'injection de NaN₃ ou NaNO₃ (0,6g.L⁻¹). L'étalon polysaccharidique est constitué de Dextran sulfate 500 kDa, Dextran 70 kDa et Dextran 50 kDa tous de Sigma.

VII.4. Chromatographie Liquide-Gaz

La chromatographie en phase gazeuse est une chromatographie qui permet la séparation et l'identification d'un mélange complexe de composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés sans décomposition par triméthylsilylation. L'obtention de méthylglycosides triméthylsilylés, passe par une méthanolyse suivie d'une pertriméthylsilylation, à partir des monosaccharides constituant l'échantillon étudié, selon la méthode de Kamerling et al. (1975), modifiée par Montreuil et al. (1986).

L'inositol (20 µg) est ajouté comme standard interne dans l'échantillon qui est congelé puis lyophilisé. L'échantillon anhydre est directement méthanolysé avec 1 mL de MeOH/HCl 1 M (Instant methanolic HCl, Sigma), 24 h à 80°C dans un tube d'hydrolyse SVL (Pyrex). Il est ensuite séché à l'azote anhydre, puis repris par 1mL de MeOH anhydre avant d'être délipidé par 3 lavages successifs à l'heptane (v/v). Après un nouveau séchage à l'azote anhydre, sont ajoutés 100 µL du réactif suivant: BSTFA (Bis-SilylTriFluoroAcétamide) à 1%, additionné de TMCS (TriMéthylChloroSilane, GRACE) et de 100 µL de pyridine pour l'étape de triméthylsilylation. Le mélange réactionnel est alors placé à 28°C, pendant 2 h. Les échantillons sont conservé à -20°C avant l'analyse en CLG.

Les dérivés TMS (1 µL) sont analysés en CLG munie d'une colonne capillaire CP Sil 5 CB (0,32 mm w 50 m, 11 µm; Chrompack). Les dérivés séparés et volatilisés dans la colonne sont détectés par ionisation de flamme (FID); le gaz vecteur est l'azote sous pression de 0,45 bar. Les aires des dérivés triméthylsilylés sont intégrées et servent à établir la composition glycosidique relative de l'échantillon dérivé. L'attribution des pics est réalisée par comparaison aux temps de rétention des monosaccharides standards. Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage relatif par rapport à l'ensemble des monosaccharides détectés.

VIII. ANALYSES

ELECTROPHORETIQUES

VIII.1. Electrophorèse unidimensionnelle sur gel de polyacrylamide

L'électrophorèse est la séparation des molécules chargées sous l'effet d'un courant électrique. Les protéines sont séparées uniquement en fonction de leur taille sur un gel de polyacrylamide dénaturant contenant du sodium dodécyl sulfate (SDS).

VIII.1.1. Principe

Les protéines sont dénaturées à 95°C en présence d'un excès de détergent, le SDS, et d'un agent réducteur le β -mercaptoéthanol. Le SDS détruit les structures secondaire, tertiaire et quaternaire des protéines pour former une chaîne linéaire. Le squelette polypeptidique étant globalement hydrophobe fixe la partie apolaire et hydrophobe du SDS, ainsi la protéine est recouverte de la charge négative conférée par la partie polaire hydrophile de la molécule de SDS, tandis que le β -mercaptoéthanol contribue à la dénaturation en réduisant les ponts disulfures, afin d'assurer la même densité de charges pour les unités peptidiques comportant des ponts disulfures. Les protéines présentent ainsi une charge négative uniforme et la séparation s'effectue donc uniquement selon le critère taille.

VIII.1.2. Préparation des échantillons

Les échantillons (5 μ g ou 15 μ g de protéines pour une coloration à l'argent ou au bleu de coomassie) sont repris avec du tampon de charge (tris(hydroxyméthyl) aminométhane 50 mM; SDS 2%; glycérol 10%; Bleu de bromophénol 0,1%; β mercaptoéthanol 1% (v/v)). Ils sont portés à ébullition pendant 5min, puis refroidis aussitôt dans la glace avant d'être déposés dans les puits du gel.

VIII.1.3. Séparation

La séparation est effectuée sur des gels à 8 %, 10 % ou à gradient de 8 à 16% de polyacrylamide (BiorRad). La migration se fait à 12,5 mA pendant 15 min, puis à 25 mA pendant 30 min par gel dans un tampon Tris-glycine SDS 0,5% (Laemmli, 1970).

VIII.2. Coloration des protéines à l'argent

La coloration à l'argent est basée sur la réduction de l'ion argent par le groupe –SH des protéines (Blum et al., 1987). Elle permet de détecter de 0,1 à 0,5 ng de protéines par bande. Après une fixation de 3 h dans une solution d'éthanol 50%, avec de l'acide acétique 12% (solution de fixation), il est rincé 3 fois pendant 20 min avec de l'éthanol 50%. Il est alors placé dans une solution de thiosulfate de sodium (0,0127%) pendant une minute, avant d'être rincé avec de l'eau ultra pure 3 fois 30 s. L'imprégnation à l'argent est effectuée par une solution de nitrate d'argent à 0,2%, formaldéhyde à 0,03%, pendant 20 min. Le gel est à nouveau rincé brièvement à l'eau ultra pure avant que la révélation des protéines ne soit réalisée à l'aide d'une solution contenant 0,0004% de thiosulfate de sodium, 6% de carbonate de sodium et 0,02% de formaldéhyde. La coloration est arrêtée par un transfert du gel dans de l'eau ultra pure, avant d'être fixée par la solution de fixation pendant 10 min. Le gel est conservé dans l'éthanol 50%, puis séché entre deux feuilles de cellophane (Biorad).

VIII.3. Coloration des protéines et des AGPs au bleu de Coomassie couplé au Yariv

VIII.3.1. Principe

Le bleu de Coomassie se lie aux acides aminés basiques et aromatiques. C'est une coloration très peu sensible qui nécessite un dépôt de 15 µg de protéines environ par puit. Le réactif de Yariv (β -Glucosyl Yariv) a la capacité de former un précipité rouge brique en présence d'AGPs.

VIII.3.2. Coloration

Après la migration, le gel est lavé, par 3 bains de 10 min chacun, avec à l'eau ultra pure, puis coloré pendant 1 h au bleu de Coomassie (Page blue protein staining) de Fermentas. Il est ensuite décoloré à l'eau puis incubé toute la nuit, sous agitation dans une solution de Yariv à

0,3% dans du NaCl à 1% (Maurer et al., 2010). Le gel est décoloré dans une solution de NaCl à 1% puis numérisé.

VIII.4. Coloration des protéoglycanes au bleu alcian

VIII.4.1. Principe

Le bleu alcian est un colorant de phtalocyanine à base de cuivre. C'est un colorant polyvalent basique qui établit des liaisons électrostatiques avec des polyanions comportant des radicaux carboxyliques ($-\text{COO}^-$) et sulfuriques ($-\text{SO}_3^-$) à pH 2,5 ou uniquement sulfurique à pH 1. Ce colorant permet d'identifier les protéoglycanes acides à pH 2,5 et les protéoglycanes sulfatés à pH 1 (Tobisawa et al., 2010).

VIII.4.2. Protocole de coloration

Le gel est transféré après la migration à 30°C dans une solution d'acide trichloroacétique à 0,5% pour la fixation des protéines. Il est ensuite lavé par 2 fois de 2 min chacune dans la solution d'acide acétique à 5% (solution I), puis 20 min dans une solution d'oxydation (acide périodique à 1%). Il est ensuite soumis à deux lavages d'une min avec la solution I et deux lavages de 2 min à l'eau ultra pure et, enfin, 12 min dans une solution de réduction (métabisulfite de sodium 0,5%). Le gel est alors placé à 50°C avant d'être lavé, par 2 fois de 2 min chacune, dans de l'eau ultra pure et 2 fois de 2 min dans une solution II de lavage (éthanol 25%, acide acétique 10%). Il est ensuite coloré pendant 15 min avec du bleu alcian (à 0,125% préparé dans solution II). Enfin, le gel est décoloré 1, 3 et 5 min dans la solution II, puis 2 et 4 min dans la solution III de lavage (10% éthanol, 5% acide acétique).

VIII.5. Coloration des glycoprotéines à l'acide périodique de Schiff (PAS)

VIII.5.1. Principe de coloration au réactif de Schiff

Cette coloration est le résultat de deux réactions chimiques qui sont dues à l'action de l'acide périodique et du réactif de Schiff. L'acide périodique ($\text{HIO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) permet l'oxydation des groupements glycols (CHOH-CHOH) car il est capable de rompre les liaisons entre deux

carbones. Il y a alors formation de groupes aldéhydes (HC=O) sur lesquels se fixera le réactif de Schiff, donnant ainsi une coloration rouge pourpre (Fairbanks et al., 1971).

VIII.5.2. Protocole de coloration

Après l'électrophorèse, le gel est directement placé dans une solution de fixation constituée d'acide acétique 10% et d'isopropanol 25%, pendant 2 h. Après 3 lavages de 30 s, le gel est placé 2 h dans une solution d'oxydation (acide périodique 1% et acide acétique 3%). Il est ensuite lavé par 3 fois de 30 min chacune, puis incubé toute la nuit dans le réactif de Schiff. L'excès de coloration est enlevé grâce à une solution réductrice de méta bisulfite de sodium 0,5%. Le gel est numérisé puis séché.

IX. ANALYSES IMMUNOLOGIQUES

IX.1. Western blot

Après électrophorèse, les protéines sont transférées sur membrane de PVDF (Roche Diagnostics GmbH) (Burnette, 1981). Le transfert se réalise en conditions «semi-sec», selon la méthode sandwich dans le tampon de transfert (Tris 25 mM, Glycine 192 mM, méthanol 20%, SDS 0,01%) sous une intensité de 200 mA pendant 1 h. Un contrôle d'efficacité du transfert électrophorétique est réalisé par une coloration réversible des protéines au Rouge Ponceau à 0,05% dans l'acide acétique à 1%. La décoloration des protéines est obtenue par rinçage à l'eau distillée.

IX.2. Dot blot

C'est une technique qui permet de rechercher la présence de certains épitopes d'AGPs par immuno détection avec des anticorps spécifiques. Trois microlitres de solution sont déposés sur une membrane de nitrocellulose (Pall Life science BIO Trace™ NT). La membrane est séchée à l'air libre et directement utilisée pour la saturation des sites de protéines.

IX.3. Immuno marquage des AGPs sur membrane

Les membranes sur lesquelles sont transférées ou déposées les protéines sont placées sous une agitation douce, dans une solution de lait écrémé à 5% (w/v) dans du TBS-T, pendant 3 h. Les sites d'interaction non spécifiques sont saturés au contact du lait écrémé. La membrane est incubée pendant une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire, à la concentration adéquate, dans une solution contenant du TBS-T dans 1% de lait écrémé. Puis, elle est rincée par trois fois de 15 min chacune dans du tampon TBS-T. Dans l'étape suivante la membrane est placée, pendant 1 h et sous agitation, dans la solution de TBS-T dans 1% de lait écrémé à laquelle est ajouté l'anticorps secondaire. Il s'agit d'un anti IgG de rat, associé à la phosphatase alcaline, dilué au 1/10000^{ème}. La membrane est à nouveau rincée 3 fois au TBS-T puis incubée dans la solution de révélation 1-StepTM NBT/BCIP de thermo scientifique.

Tableau 2 : Anticorps anti AGPs, leur spécificité et leur dilution.

Anticorps	Epitopes	Sources	Références	Fournisseur	Dilution
LM 2	AGPs	IgM de rat	Smallwoold et al., 1996	Plantprobes	1/50
JIM 4	AGPs	IgM de rat	Knox et al., 1989	Carbosources	1/100

IX.4. Immunomarquage des AGPs par or-colloïdal et par fluorescence

Les grilles en or portant les coupes d'échantillons sont placées pendant 45 min sur une solution de blocage (PBS 1X pH 7,4, Tween 20 0,1%, BSA 2%) pour la saturation des sites de fixation aspécifiques. Trois rinçages dans le PBS 1X pH 7,4, Tween 20 0,1% de 10 min chacun sont ensuite réalisés et suivis d'une incubation de 12 h en chambre humide avec l'anticorps primaire. Après quatre lavages, dont un de 10 min par une solution de PBS 1X à pH 7,4, Tween 20 à 0,1%, et trois de 10 min chacun par une solution de PBS 1X à pH 7,4, Tween 20 à 0,5%, les coupes sont incubées pendant 3 h avec l'anticorps secondaire. Après plusieurs lavages (PBS pH 7,4, Tween 20 à 0,5%: 3 x 10 min ; eau ultra-pure: 2 x 10min) les coupes sont mises à sécher. Elles sont observées au MET.

Les coupes sont déparaffinées et réhydratées progressivement par des bains d'une minute d'éthanol à 100%, puis d'éthanol à 95% dans du PBS, puis d'éthanol à 75% dans du PBS et enfin dans le PBS. La saturation des sites de fixation aspécifique est réalisée dans une solution de blocage (PBS pH 7,4, BSA 2%), pendant 45min. Trois rinçages dans la solution (PBS pH 7,4) de 10 min chacun sont suivis d'une incubation de 12h avec l'anticorps primaire JIM 8/ LM 14 dilué dans la solution de PBS pH 7,4, BSA 2%. Après un lavage de 10 min dans le PBS à pH 7,4, et trois lavages de 10 min chacun dans ce PBS à pH 7,4, les coupes sont incubées pendant 3 heures avec l'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome. Les lavages successifs, de 3 fois 10 min dans le PBS pH 7,4 et de 2 fois 10 min dans de l'eau ultra pure permettent d'enlever l'excédent d'anticorps. Les coupes sont incubées 5 min dans du bleu de toluidine à 0,1% dans du PBS, puis lavées 3 fois de 10 min chacune dans du PBS filtré à 0,1 µm. Les coupes sont montées entre lame et lamelles dans une goutte de glycérol/PBS (v/v). Elles sont observées au microscope à fluorescence couplé à une caméra d'acquisition d'images.

Deux types de contrôles sont réalisés. L'un pour lequel l'anticorps primaire JIM 8 est couplé à un mauvais anticorps secondaire produit chez le même animal. L'autre où seul l'anticorps secondaire est appliqué en absence d'anticorps primaire.

X. ANALYSES SPECTRO - FLUORIMETRIQUES

X.1. Principe

La spectrofluorimétrie est une méthode, plus sensible que l'UV, qui permet d'analyser les émissions de fluorescence des composés excités par des photons d'un faisceau lumineux UV. La fluorescence propre à chaque composé permet de caractériser la substance analysée.

X.2. Matrice d'excitation-émission fluorescence en 3 dimensions (3D)

L'analyse des échantillons par spectrofluorimétrie 3D permet d'obtenir les spectres de fluorescence de composés organiques par un balayage simultané d'une plage spectrale de longueurs d'onde d'excitation (220 à 500 nm) et d'émission (250 à 550 nm).

Les AGPs préparées pour la chromatographie d'exclusion sont diluées dans la solution de la phase mobile. Le spectre fluorescence 3D est réalisé sur un spectro-fluorophotomètre Shimadzu RF-5301PC. Les données sont analysées grâce au programme Panorama.

PARTIE C. RESULTATS

I. CARACTERISATION MORPHOLOGIQUE, HISTOLOGIQUE ET BIOCHIMIQUE DES STADES DE DEVELOPPEMENT DES EMBRYONS

L'amélioration génétique des plantes nécessite la maîtrise de techniques de propagation des génotypes sélectionnés. Chez le cacaoyer, la multiplication des clones sélectionnées est rendue possible grâce à l'embryogenèse (De Silva et al., 2008). De ce fait, la production en masse d'embryons somatiques a fait l'objet de nombreuses études qui, tout en améliorant la technique, n'ont pas permis d'en assurer sa maîtrise (Li et al., 1998 ; Maximova et al., 2002 ; Minyaka et al., 2008 ; Niemenak et al., 2008). Si cet état de fait existe pour d'autres plantes, certains auteurs ont entrepris des analyses comparatives entre le développement embryonnaire zygotique et somatique (Górska-Koplińska et al., 2010 ; Lara-Chavez et al., 2012). Chez le cacaoyer, Alemanno et al. (1997) ont comparé le développement morphologique, histologique et physiologique des embryons zygotiques et somatiques. Si plus de 80% des embryons somatiques présentent des malformations importantes, des différences physiologiques ont également été observées quant à l'accumulation des réserves amylacées et des réserves protéiques. Les embryons somatiques sont moins riches en amidon et en protéines et beaucoup plus riches en H₂O que les embryons zygotiques. Dangou et al. (2002) ont mis en évidence l'abondance de sulfate dans l'albumen de cacaoyer à différents stades de développement. Plus récemment, Emile et al. (2007) ont montré l'implication de la cystéine, du glutathion et de la cystéine synthase au cours de l'embryogenèse zygotique de *T. cacao* SNK 10, Sca 6. Ces travaux ont conduit à l'amélioration des conditions de culture des embryons somatiques où un apport de sulfate améliore l'embryogenèse somatique du cacaoyer (Minyaka et al., 2008). Dans les travaux antérieurs, les embryons zygotiques ont été prélevés sur une base temporelle : le nombre de jours après la pollinisation (Alemanno et al., 1997 ; Niemenak et al., 2012).

Cependant, en étudiant l'embryogenèse zygotique du cacaoyer, Emile et al. (2007) ont décrit la présence d'embryons de stades de développement différents dans une même cabosse. L'utilisation du nombre de jours après la pollinisation est donc un critère qui peut entraîner des confusions à propos des stades de développement des embryons zygotiques. Au cours de l'étude comparée de l'embryogenèse zygotique et somatique, réalisée par Alemanno et al. (1997), les stades de développement des embryons zygotiques n'ont pas pu trouver d'équivalent temporel avec les embryons somatiques. Cette imprécision, quant à la qualification des stades de développement embryonnaire du cacaoyer, est accentuée par l'asynchronisme observée au cours de l'embryogenèse somatique (Maximova et al., 2002 ; Minyaka et al., 2008). Dans ces conditions, les embryons zygotiques et somatiques sont difficilement comparables, alors qu'ils présentent des caractères morphologiques et physiologiques similaires (Dodeman et al., 1997 ; Fras et al., 2008). En effet, plusieurs facteurs de transcription dont ABI3 et AGL12 s'expriment à la fois au cours de l'embryogenèse zygotique et somatique. De plus l'expression des gènes LEA semblent similaire quelque soit le type d'embryogenèse considérée (Ikeda et Kamada, 2005).

Afin de s'affranchir des problèmes précités, nous avons souhaité normaliser, le plus rigoureusement possible, le matériel biologique dont nous disposons pour cette étude. Pour ce faire, nous proposons de qualifier 7 stades de développement des embryons zygotiques et somatiques sur la base des critères morphologiques qu'on retrouve aussi bien dans les embryons zygotiques que dans les embryons somatiques : la forme et la taille de l'embryon, la taille et la couleur et les cotylédons. Une analyse histologique a été réalisée dans le but de suivre l'évolution des tissus en fonction des stades identifiés suivant les critères morphologiques. Cette caractérisation doit permettre à la fois d'homogénéiser le matériel biologique servant à l'analyse des AGPs tout en facilitant les analyses comparatives.

I.1. Caractérisation morphologique des embryons de cacaoyer

Les caractères morphologiques de forme, de couleur, et de taille sont utilisés pour différencier les stades de développement. Sept stades, notés I, II, III, IV, V, VI, VII sont identifiés aussi bien pour les embryons zygotiques que somatiques. Les trois premiers stades correspondent aux stades globulaire (I), cordiforme (II) et torpille (III) de l'embryogenèse au sens strict. Les stades cotylédonaires de IV à VII sont identifiés sur la base de la taille et de la couleur des cotylédons.

I.1.1. Obtention et caractérisation morphologique des embryons zygotiques

Seuls les embryons zygotiques du clone Sca 6 seront présentés dans cette partie. En effet, les 2 autres clones utilisés dans ce travail n'ont pas présenté de différences morphologiques significativement à celles du clone Sca 6. Les embryons zygotiques ont été collectés au Cameroun à partir de cabosses de maturité différentes (Fig. 14A). Plusieurs cabosses sont utilisées, chacune comportant entre 30 à 40 embryons. Des embryons de stades différents sont retrouvés dans une même cabosse. Les embryons proches du pédoncule présentent un stade de développement plus avancé que ceux retrouvés à l'extrémité du fruit. La coupe transversale d'une chérelle montre que la placentation est axillaire. La graine immature renferme, en plus de l'albumen liquide, de l'albumen cellularisé qui entoure l'embryon. La cellularisation de ce tissu nourricier évolue au cours du développement des embryons. L'embryon dans les premiers stades de son développement se situe dans la partie de la fève reliée au funicule.

Les embryons prélevés sont identifiés suivant des critères précédemment définis. Du stade I au stade III, la taille des embryons à isoler est telle que ces derniers ont été prélevés avec l'ensemble des tissus devant conduire à la formation de la future graine. En effet, les embryons du stade I font environ 15 µm et sont contenus dans un nucelle de 1 mm de long (distance entre micropyle et hile). Pour les embryons du stade II, la taille du nucelle est de 3 mm et au stade III elle est de 8 mm. Pour les autres stades, l'embryon est suffisamment gros pour être isolé séparément du nucelle. La distinction des différents stades cotylédonaire (Figure 14IV – VII) est facilitée par la pigmentation et la taille des cotylédons. L'embryon au stade IV (Fig.14IV) présente des cotylédons d'environ 1 à 4 mm de large sans plis, alors qu'au stade V (Fig. 14 V) les cotylédons sont plus développés et présentent des plissements mais pas de pigmentation. L'embryon au stade VI (Fig. 14 VI) est partiellement pigmenté au niveau des cotylédons. Le stade VII (Fig. 14 VII) correspond au stade où les embryons présentent une pigmentation complète et intense. Du stade IV au stade VII un embryon cotylédonaire croît en taille d'environ 11 mm et en masse de 500 mg chez Sca 6. Cependant, si les différences morphologiques n'existent pas, la taille et la masse des tissus embryonnaires obtenus varient entre les différents clones de cette étude : 13 mm et 600 mg chez SNK 630, 15 mm et 800 mg chez ICS 60.

Pour réaliser l'analyse comparée des embryons zygotiques et somatiques, les caractères identiques ont été utilisés pour identifier les stades de développement des embryons somatiques.

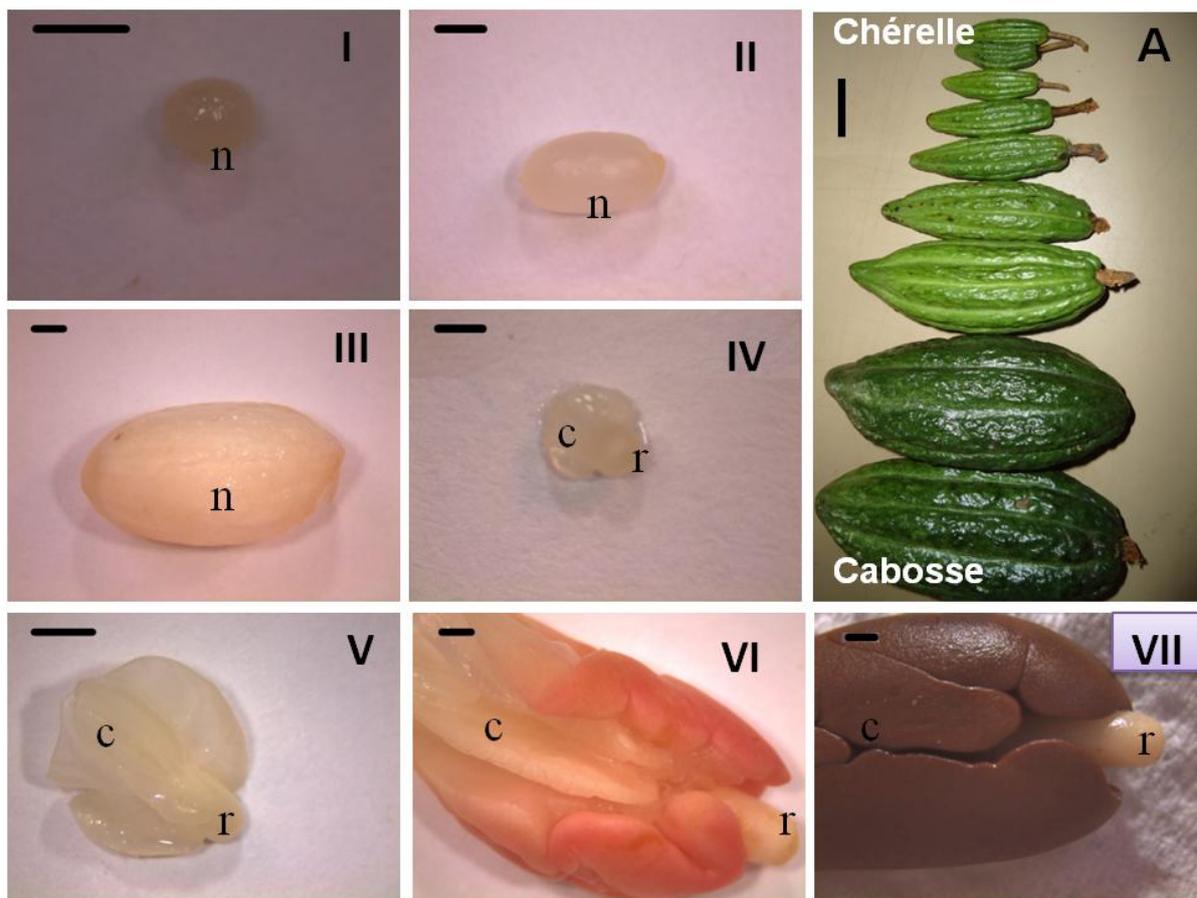


Figure 14 : Embryons zygotiques à différents stades de développement (I, II, III, IV, V, VI, VII) prélevés dans des cabosses de maturité différentes du clone Sca 6 (A). Embryons renfermés dans le tissu nucellaire (I) stade globulaire, (II) stade cordiforme, (III) stade torpille; Embryons isolés IV-VII stades cotylédonaires; c, cotylédon; n, nucelle; r, radicule; trait = 1 mm. Les cabosses ont été collectées au Cameroun (cf matériel et méthodes).

I.1.2. Production et caractérisation des embryons somatiques

Les embryons primaires sont obtenus à partir des staminodes (étamines stériles) et des cuculles (base des pétales) tandis que les embryons secondaires sont obtenus à partir des fragments de cotylédons des embryons primaires.

I.1.2.1. Les embryons somatiques primaires

Un mois après l'initiation de la culture, l'explant évolue en cal blanchâtre (Fig. 15A). Certains de ces cals, placés sur un milieu sans hormones contenant 30 g/ml de saccharose et 2,94 g/l de $MgSO_4$ supplémentaire, ont permis l'induction de la formation d'embryons dits embryons primaires. Ils apparaissent dès la 7^{ème} semaine après initiation pour le clone Sca 6, à la 11^{ème} semaine chez SNK 630 et à la 15^{ème} semaine chez ICS 60. Ces observations montrent que la

formation d'embryons primaires du clone Sca 6 est précoce par rapport au clone SNK 630, par opposition, le clone ICS 60 est tardif. Les embryons se développent sur les cals embryogènes de manière asynchrone, ainsi des embryons de formes et tailles différentes peuvent être observés sur le même cal (Fig. 15B1 et B2) indépendamment du clone.

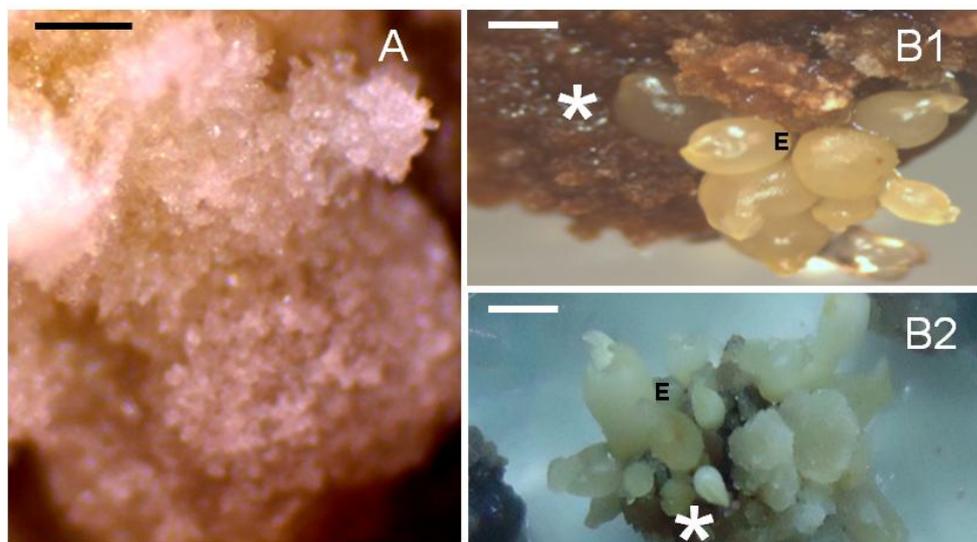


Figure 15 : Développement des embryons primaire sur des cals. (A), cal blanchâtre non embryogène. (B) cal embryogène (astérisque) portant des embryons : (B1) chez le clone ICS 60, (B2), chez le clone Sca 6; trait = 1 mm.

Les embryons sont prélevés séparément. Les sept stades de développement, précédemment définis, sont détaillés comme suit. Le stade I (Fig. 16I) est caractérisé par sa forme globulaire et mesure environ 800 μm de diamètre. Le stade II (Fig. 16II), cordiforme, mesure environ 1,2 mm de long tandis que le stade III (Fig. 16III) est d'environ 1,6 mm de long. Le stade IV (Fig. 16IV) est caractérisé par la présence de cotylédons peu développés et d'une taille réduite de l'axe. Le stade V (Fig. 16V) présente des cotylédons développés, non colorés, et un axe développé. Au stade VI (Fig. 16VI) les embryons ont des cotylédons développés présentant un début de pigmentation. Le stade VII (Fig. 16VII), qui est le dernier stade considéré, est caractérisé par la pigmentation des cotylédons, et un développement maximal des embryons. La particularité morphologique des embryons somatiques primaires est marquée par le faible développement des cotylédons par rapport à l'axe. La taille de l'axe est donc pris en compte pour différencier les stades IV (axe $\leq 5\text{mm}$) et V (axe $\geq 5\text{mm}$) présentant des cotylédons non pigmentés. Des embryons primaires présentant des malformations, telles que la présence d'un ou de plusieurs cotylédons sont observées.

Afin d'obtenir des embryons sans formation tératologique et d'origine unicellulaire (Maximova et al., 2002), nous avons initié la formation d'embryons somatiques secondaires, à partir des cotylédons des embryons somatiques primaires, au stade VII suivant le protocole décrit par (Maximova et al., 2002).

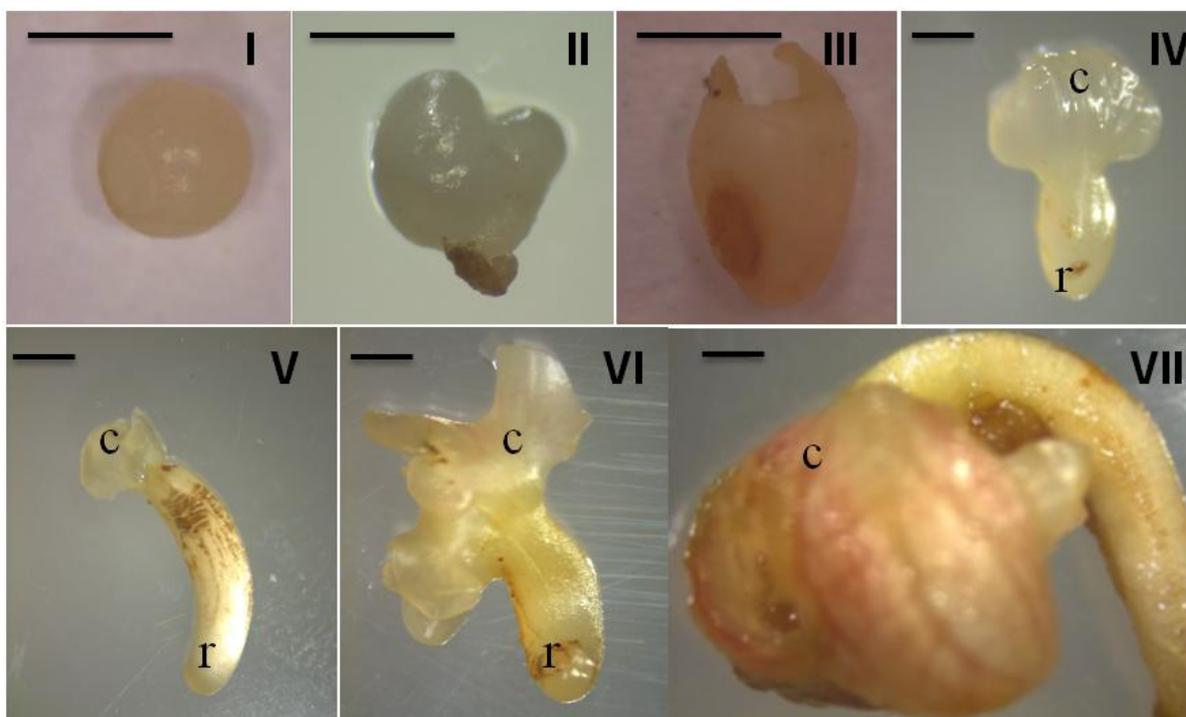


Figure 16 : Embryons somatiques primaires de *T. cacao* clone Sca 6 à différents stades de développement. (I), stade globulaire ; (II), stade cordiforme ; (III), stade torpille ; (IV-VII), stades cotylédonaires. C, cotylédon; r, radicule; trait = 1mm.

I.1.2.2. Les embryons somatiques secondaires

Les fragments de cotylédons (Fig. 17B) de 4 mm² environ ont été mis en culture sur un milieu enrichie en auxine (2,4 D) et en cytokine (BAP).

Après 14 jours de culture, un nouveau cal embryogène apparaît. Les embryons sont observés à la 4^{ème} semaine après la mise en culture (Fig. 17C). A ce stade, aucune différence clonale quant à l'apparition des embryons n'est observable. Cependant, après 6 semaines de culture, le pourcentage de cals embryogènes diffère en fonction des génotypes. Les valeurs sont 50 % pour Sca 6, 41 % pour SNK 630 et 25 % pour ICS 60. L'effet du génotype n'est pas annulé par l'embryogenèse somatique secondaire.

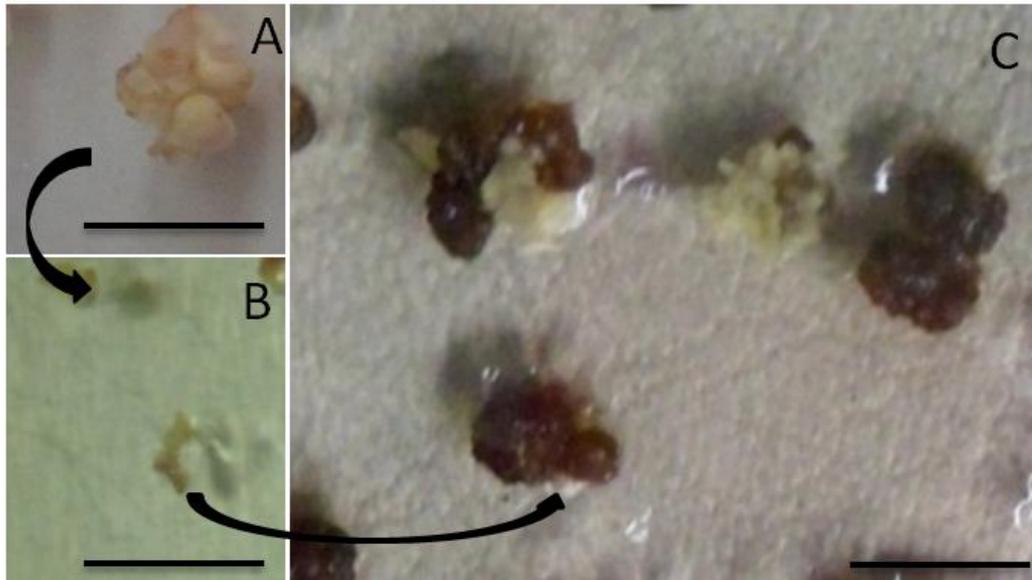


Figure 17 : Processus d'embryogenèse somatique secondaire de *T. cacao* clone SNK 630. A, Cotylédons d'embryons primaires. B, Fragments de cotylédons. C, Cals portant des embryons, trait = 1 cm.

Afin d'améliorer la production massale d'embryons et d'analyser le milieu de culture où les embryons somatiques secondaires se développent, la production d'embryons est réalisée dans un système à immersion temporaire automatique. Les cals embryogènes, formés après 4 semaines de culture sur milieu solide, sont introduits dans le récipient à immersion temporaire automatique (RITA). Les cultures immergées pendant 1 min toutes les 6 heures produisent des embryons semblables, en tout point, aux embryons somatiques secondaires produits sur milieu solide. Grâce au RITA nous avons réussi à augmenter la masse d'embryons produits après deux mois de culture pour les différents génotypes: de 50 % pour le clone Sca 6 ; de 60 % pour SNK 630 et de 16 % pour le clone ICS 60 (Fig. 18).

Les embryons secondaires formés sont identifiés suivant les mêmes critères que les embryons somatiques primaires. Le stade I présente une forme globulaire (Fig. 19I) et mesure environ 250 μm de diamètre. Le stade II en forme de cœur mesure environ 500 μm (Fig. 19II). Le stade III, stade torpille, qui atteint 1 à 2 mm est suivi par les stades cotylédonaires (Fig. 19III). Le stade IV présente un axe de taille réduite d'environ 2 mm et des cotylédons non colorés (Fig. 19IV). Au stade V les cotylédons demeurent non colorés mais sont plus développés avec un axe d'environ 5 mm. Au stade VI les cotylédons sont partiellement pigmentés, et au stade VII ils sont complètement (Fig. 19VI-VII). La taille de l'axe est de 7 mm au stade VI et reste inchangée au stade VII. Ces embryons secondaires aux stades précoces (Fig. 19) ressemblent aux embryons primaires (Fig. 16). En revanche, aux stades cotylédonaires ils présentent une forme régulière (Fig. 19 IV-VII) par rapport aux embryons somatiques primaires. De plus, la

pigmentation des cotylédons est plus uniforme dans les embryons somatiques secondaires par rapport aux embryons somatiques primaires.

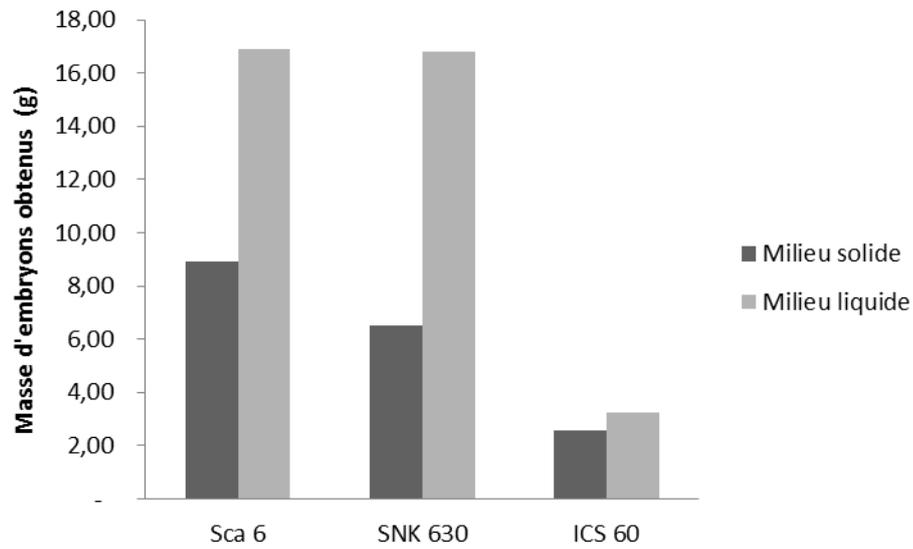


Figure 18 : Comparaison des biomasses embryogènes (g) produites par chacun des 3 génotypes (Sca 6, SNK 630, ICS 60) après 2 mois de culture en milieu solide et grâce au système d'immersion temporaire RITA.

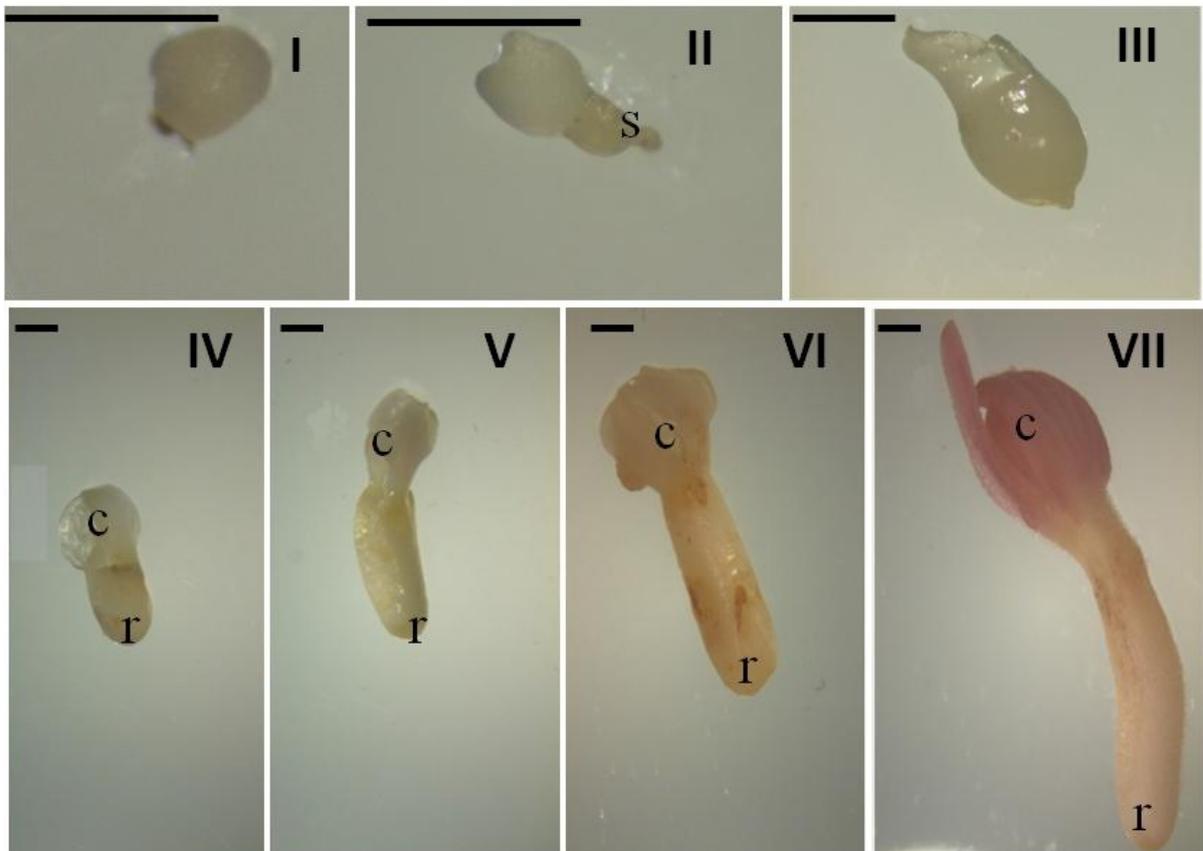


Figure 19 : Embryons somatiques secondaires à différents stades de développement, I-VII du génotype SNK 630. C, cotylédon; r, radicule; s, suspenseur; trait = 1mm.

I.2. Caractérisation histologique des embryons zygotiques et somatiques de cacaoyer

Afin d'apporter d'autres éléments de caractérisation des différents stades embryogènes, nous avons réalisé une analyse histologique des embryons. Cette approche nous permet de prendre en compte l'évolution histologique qui accompagne les modifications morphologiques sus citées.

I.2.1. Les embryons zygotiques

Les embryons zygotiques sont étudiés du stade IV au stade VII. Les coupes d'embryons isolés, inclus dans la paraffine, sont observées au microscope optique après une coloration au PAS/Naphtol. Le développement important des cotylédons des embryons zygotiques nous a poussé à leur accorder une attention particulière. Les cotylédons des embryons au stade IV sont comparés aux cotylédons des embryons au stade VII. Rappelons que ces deux stades sont les stades cotylédonaires extrêmes caractérisés par l'absence (stade IV) et la présence de pigmentation (stade VII). L'analyse histologique des fragments de cotylédons à ces deux stades montrent une imprégnation plus intense du PAS/Naphtol au stade VII (Fig. 20B VII) par rapport au stade IV (Fig. 20B IV). Par ailleurs, on peut également observer dans ces cotylédons des vésicules colorées qui sont plus abondantes au stade VII par rapport au stade IV. Ces vésicules sont également présentes dans les cotylédons au stade VI (Fig. 20). Cette différence montre qu'il y a bien une évolution de la composition osidique des stades IV à VII et que ces stades diffèrent par l'organisation tissulaire des cotylédons (Fig. 20A IV et VII). En étudiant l'axe, nous nous sommes intéressés à l'aspect général aux stades IV et VII, mais aussi à l'évolution de certains tissus tel que la zone méristématique apicale et le tissu vasculaire. Au stade IV, on distingue dans la coupe longitudinale de l'axe, un épiderme, une zone corticale, un tissu vasculaire et une zone médullaire (Fig. 20 IV). Tous les tissus, mis en place au stade IV, sont présents dans la section partielle de l'axe au stade V (Fig. 20 V) et sont observables au stade VII.

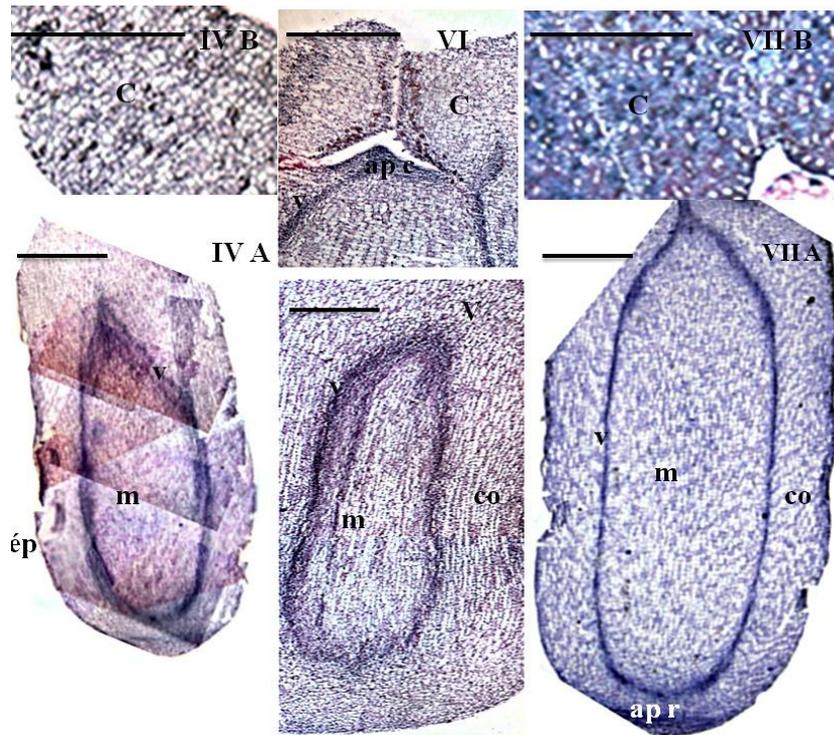


Figure 20 : Caractérisation histologique des embryons zygotiques de cacaoyer aux stades cotylédonaire IV à VII. IV A, axe du stade IV; IV B cotylédon du stade IV ; V fragment de l'axe d'un embryon au stade V; VI, fragment d'un embryon au stade VI; VII A, axe d'un embryon au stade VII ; VII B, fragment de cotylédon d'un embryons au stade VII; apc, apex caulinaire ; apr, apex racinaire ; c, cotylédon; co cortex; m, tissu médullaire; v, tissu vasculaire; trait = 1 mm.

I.2.2. Les cals embryogène et non embryogène

Les cals sont des amas de cellules dédifférenciées parmi lesquelles certaines se redifférencieront. Les embryons somatiques apparaissent donc sur des cals qui sont dits embryogènes (Fig. 21 A). Les cals qui ne portent aucun embryon au bout de 56 semaines de culture peuvent être considérés comme non embryogènes. Une analyse histologique de ces deux types de cals vient compléter les observations montrant leurs différences de couleur. Les cals embryogènes présentent une coloration violacée plus marquée au réactif de Schiff/Naphtol que les cals non embryogènes. Les cals embryogènes, colorés en rose avec le réactif de Schiff, sont plus riches en polysaccharides alors que les cals non embryogènes, colorés en bleu semblent plus riches en protéines. Cependant, la coloration en rose dominante des parois des deux types de cals par la fuschine basique confirme bien l'abondance des composés polysaccharides. Le potentiel embryogène des cellules suggérerait alors une modification des proportions relatives de la fraction protéique par rapport à la fraction polysaccharidique au sein des cellules formant le cal.

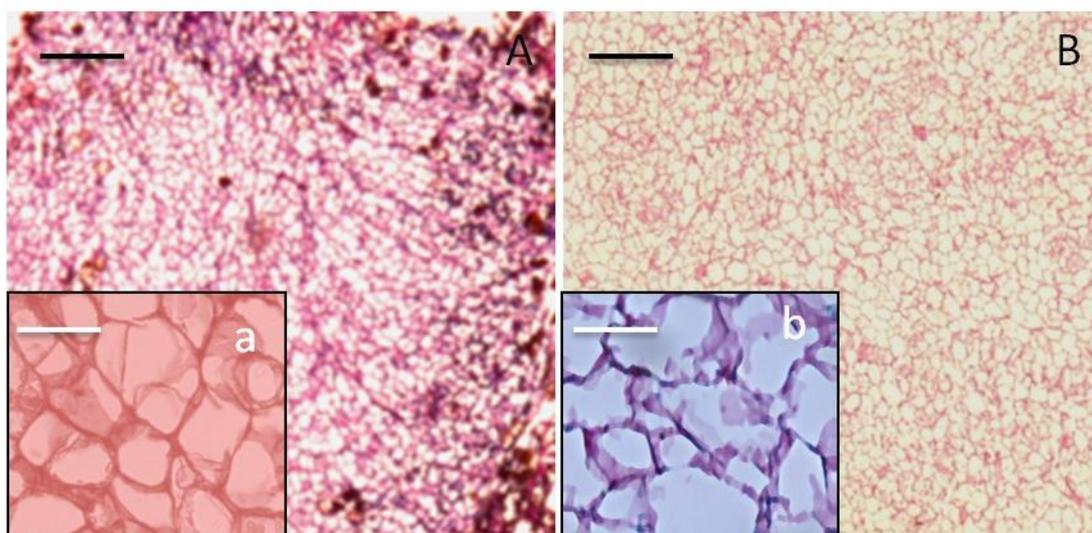


Figure 21 : Mise en évidence de l'organisation tissulaire des cals embryogènes et non embryogènes. A-a, Cal embryogène coloré au PAS/Naphtol; B-b, cal non embryogène coloré au PAS/Naphtol ; A-B trait noir = 200µm, a-b trait blanc = 40µm.

I.2.3. Les embryons somatiques

L'aspect morphologique a permis d'établir une différence entre les embryons somatiques primaires et secondaires quant à la régularité de la forme et du nombre des cotylédons. L'approche histologique vient appuyer cette différence en présentant les embryons somatiques primaires moins réguliers que les embryons somatiques secondaires. Cette comparaison a été réalisée sur les cinq premiers stades de développement. Au stade I on retrouve dans les embryons primaires (Fig. 22 I) et secondaires (Fig. 23 I), un ensemble uniforme de cellules méristématiques. Au stade II, les cellules s'organisent pour passer de la symétrie radiale à la symétrie bilatérale. Au stade torpille, l'ébauche cotylédonaire apparaît et le cortex est séparé de la région médullaire par le tissu vasculaire qui se met en place. Des observations similaires ont été faites sur les embryons zygotiques, démontrant que l'embryogenèse somatique (primaire ou secondaire) est un outil permettant de comprendre la mise en place des tissus embryogènes. Les stades embryogènes précoces sont similaires que l'on ait à faire à des embryons primaires (Fig. 22) ou à des embryons secondaires (Fig. 23). Les trois premiers stades sont les plus conventionnels et correspondent bien aux stades embryonnaires sensu stricto. Ils sont décrits chez de nombreuses autres espèces. Les stades cotylédonaires sur lesquels nous avons porté notre attention présentent, par rapport aux stades précoces, un allongement de l'axe embryonnaire. De prime abord, des différences entre les embryons somatiques primaires (Fig. 22 IV-V) et secondaires (Fig. 23 IV-V) sont observables. La structure générale des embryons

montre que l'axe et les cotylédons des embryons primaires ont une structure peu homogène et irrégulière. Les embryons secondaires présentent une structure plus homogène et plus régulière, aussi bien au niveau des cotylédons que de l'axe.

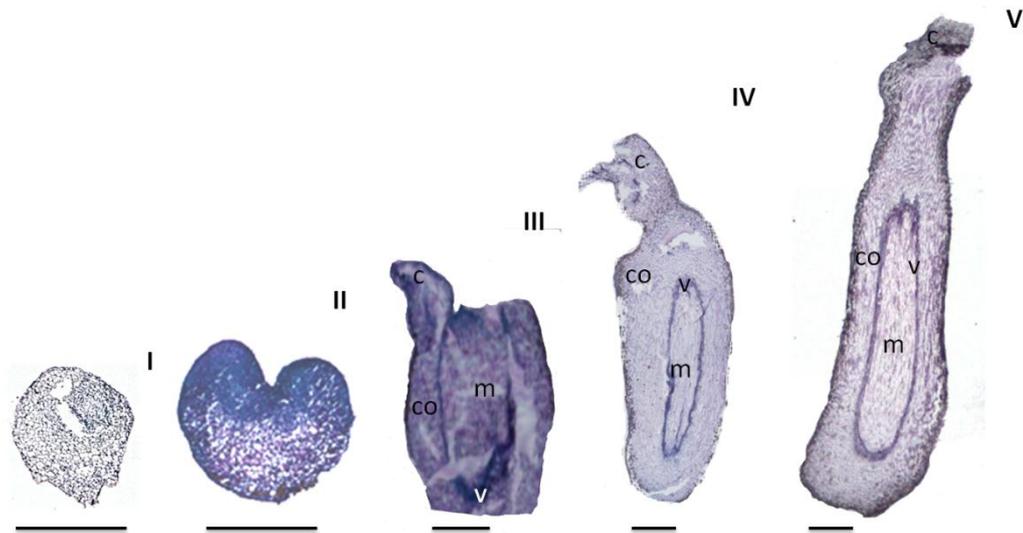


Figure 22 : Sections longitudinales d'embryons somatiques primaires aux stades I à V. I, stade globulaire ; II, stade cordiforme ; III, stade torpille ; IV et V, stades cotylédonaires. c, cotylédon; co cortex; m, tissu médullaire; v, tissu vasculaire; trait = 500 μ m.

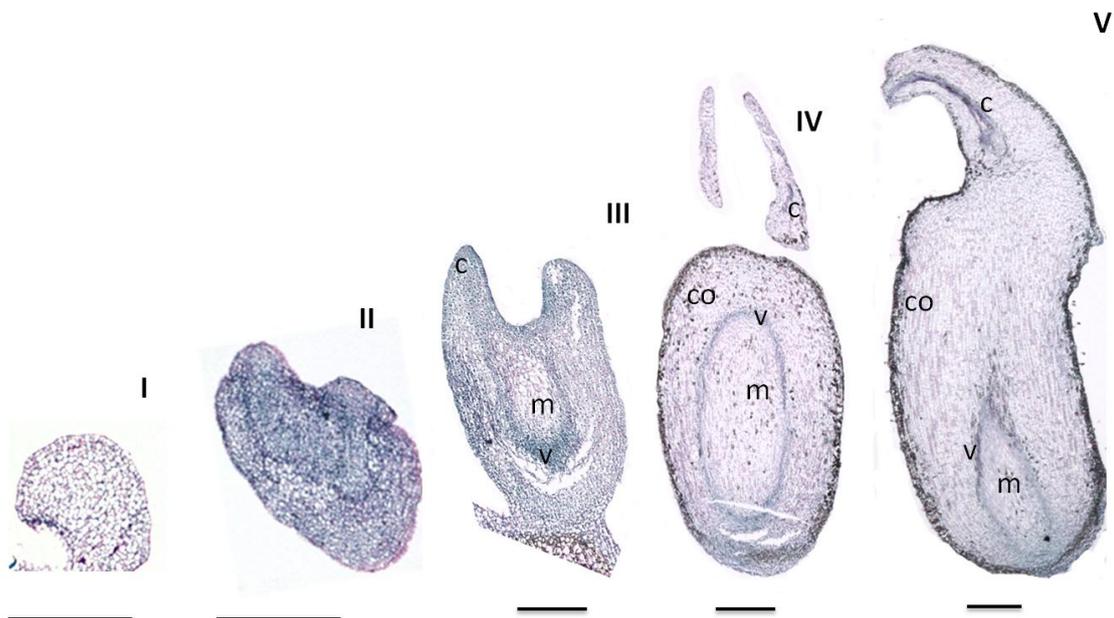


Figure 23 : Sections longitudinales d'embryons somatiques secondaires aux stades I à V. I, stade globulaire ; II, stade cordiforme ; III, stade torpille ; IV et V, stades cotylédonaires. c, cotylédon; co cortex; m, tissu médullaire; v, tissu vasculaire trait = 500 μ m.

Cependant, les analyses morphologiques et histologiques ne nous ont pas permis de différencier les trois génotypes utilisés dans notre étude qui présentent, pourtant, au cours de l'embryogenèse

somatique des réponses différenciées. C'est dans ce cadre que nous avons souhaité mettre en place une étude biochimique pouvant être capable de discriminer *via* un profil d'expression différent, chacun des 3 génotypes de notre étude.

I.3. Caractérisation biochimique des embryons zygotiques et somatiques de cacaoyer

L'absence de différences, à la fois morphologique et histologique, entre les embryons somatiques et zygotiques pour les 3 génotypes Sca 6, SNK 630 et ICS 60 de cette étude nous a conduit à rechercher un autre marqueur de caractérisation clonale au travers de l'étude du protéome. Après une mise au point d'un micro-protocole d'extraction des protéines, une analyse des profils d'expression de ces dernières a été entreprise sur les 3 génotypes de cacaoyer.

I.3.1. Mise au point du protocole d'extraction des protéines

L'obtention d'un extrait protéique de qualité représente une étape importante de l'analyse du protéome (Görg et al., 2000). La présence de polysaccharides et/ou de composés issus du métabolisme secondaire, comme les composés phénoliques, peuvent perturber tout à la fois la séparation et la révélation des protéines sur gels 1D et/ou 2D SDS-PAGE (Rose et al., 2004). Les méthodes usuelles d'extractions des protéines totales sont la méthode TCA/acétone et la méthode au phénol (Saravanan and Rose, 2004). Outre la technique d'extraction, il importait également de pouvoir extraire des protéines à partir d'une masse de matériel de départ réduite. Dans cette étude, 4 méthodes différentes d'extraction des protéines ont été testées.

(A)	Tampon d'extraction	Tampon d'extraction
		Acide trichloracétique (TCA) 10%,
		β -mercaptoéthanol 7 %
		dans de l'acétone
	Tampon de lavage	Acétone

(B)	Tampon d'extraction	Tampon HEPES 50 mM pH 7,4 NaCl 150 mM Acide ascorbique 300 mM, β mercaptoéthanol 2 %, Triton X100 0,8 %
	Tampon de lavage	Acétone
(C)	Tampon d'extraction	Tampon phosphate 50 mM, pH 7,2 β -mercaptoéthanol 7 %
	Tampon de lavage	-
(D)	Tampon d'extraction	Tampon HEPES 50 mM pH 7,4 NaCl 150 mM Acide ascorbique 300 mM β mercaptoéthanol 2 % Triton X100 0,8 %
	Tampon de lavage	-

La première méthode (A) permet d'extraire les protéines totales d'une cellule et/ou d'un tissu (protéines membranaires et solubles) et permet donc d'avoir une image des protéines exprimées. Par contre, cette méthode à l'inconvénient d'extraire, en plus des protéines, tous les polymères présents dans les cellules végétales. Le tampon d'extraction (C) ne permet d'extraire que les protéines solubles, et donc qu'une fraction du protéome. Enfin, les méthodes (B), et (D) permettent d'extraire les protéines solubles et une fraction des protéines membranaires, libérée de la bicouche phospholipidique par le Triton X100. Ces 2 dernières méthodes diffèrent alors de par la dernière étape, soit la précipitation à acétone, visant à concentrer les protéines extraites avant leurs utilisations. Ces 4 méthodes d'extraction ont été testées sur des embryons zygotiques de cacaoier du clone SNK 630 à partir 250 mg de matériel frais préalablement congelé à -80°C. Après coloration au AgNO₃, suivant la technique de Blum et al. (1989) modifiée, les profils protéiques des 4 extraits montrent à la fois des richesses moléculaires différentes, mais également des contaminations, probablement par des composés phénoliques (Fig. 24). Les profils 1D-SDS-PAGE des protéines extraites au TCA/acétone sont peu discriminants, par la

présence de composants interférant avec la migration. Certains auteurs suggèrent, ainsi, la réalisation de plusieurs séquences de lavage des protéines avec le mélange TCA/acétone afin de nettoyer l'extrait des contaminants. La méthode (C) présente elle un profil plus complexe, mais fortement enrichie en composés phénoliques, d'où les trainées observées sur le gel (Fig. 24C). Les composés phénoliques libérés de la vacuole au cours de l'extraction font partie des molécules capables de perturber la migration électrophorétique. Les extraits protéiques réalisés au cours de cette étude sont naturellement riches en molécules de défense comme les composés phénoliques. En effet, ces molécules sont produites au cours du développement embryonnaire et plus particulièrement au cours de la différenciation des embryons somatiques en réponse au stress induit par ce processus organogénétique, C'est le cas chez *Phaseolus vulgaris*, chez *Gossypium hirsutum* L. (Kouakou et al., 2007) et chez *Theobroma cacao* (Alemanno et al., 2003). L'utilisation d'anti-oxydants comme l'acide ascorbique et le polyvinylpyrrolidone (PVPP) sont autant de pièges moléculaires permettant de réduire l'impact de ces composés à la fois sur les rendements d'extraction et sur la qualité électrophorétique des profils protéiques 1D et/ou 2D.

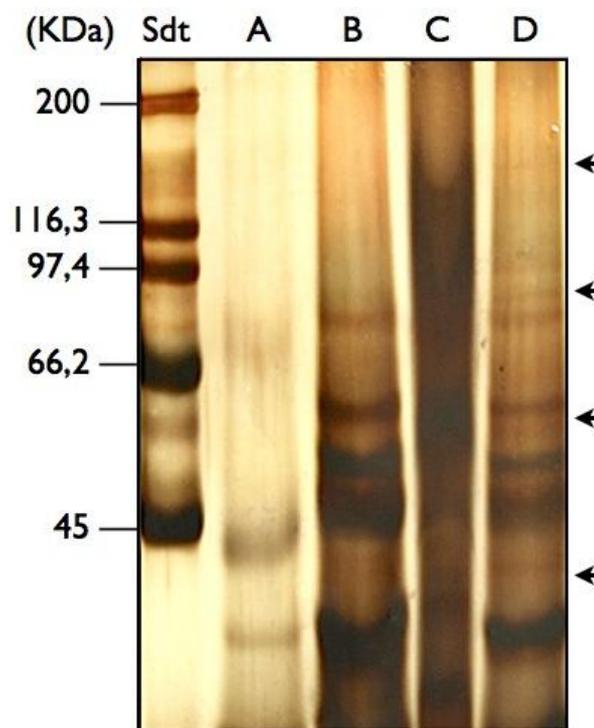


Figure 24 : Profil électrophorétique 1D SDS-PAGE de protéines extraites d'embryons zygotiques, du génotype SNK 630 au stade VII, sans cotylédons . (A), Extraction au TCA/acétone et précipitation à l'acétone; (B) Extraction au tampon HEPES puis précipitation à l'acétone ; (C), Extraction au tampon phosphate sans précipitation ; (D), Extraction au tampon HEPES sans précipitation. Les flèches montrent des bandes protéiques présentes dans l'extrait (D) et absentes dans les autres profils.

Les tampons d'extraction (B) et (D), enrichis de plusieurs de ces antioxydants, semblent les plus adaptés, à la fois de par la richesse protéique des profils obtenus que par le faible taux de contaminants observés (Fig. 24B, D). Si l'on peut améliorer encore la qualité des profils, en réalisant des séquences de lavage des extraits à l'acétone, nous avons choisi de les limiter afin de ne pas perdre trop de matériel biologique. A la suite de cette étude préliminaire, nous avons choisi de conserver pour les travaux à venir, le tampon (D) qui présentait le meilleur compromis entre richesse protéique, qualité des profils de migration et quantité de protéines extraites : le tampon HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, acide ascorbique 300 mM, β mercaptoéthanol 2%, Triton X100 0,8% sera utilisé pour la caractérisation du protéome chez le cacaoyer.

I.3.2. Analyse du protéome des embryons zygotiques et de l'albumen du cacaoyer géotypes Sca 6, SNK 630, et ICS 60.

Les protéines des différents stades de développement des embryons, prélevés sur la base des critères morphologiques, à partir des 3 géotypes de *T. cacao* Sca 6, SNK 630 et ICS 60, ont été extraites avec le tampon D, puis analysées sur gel de polyacrylamide 1D SDS-PAGE (Fig. 25).

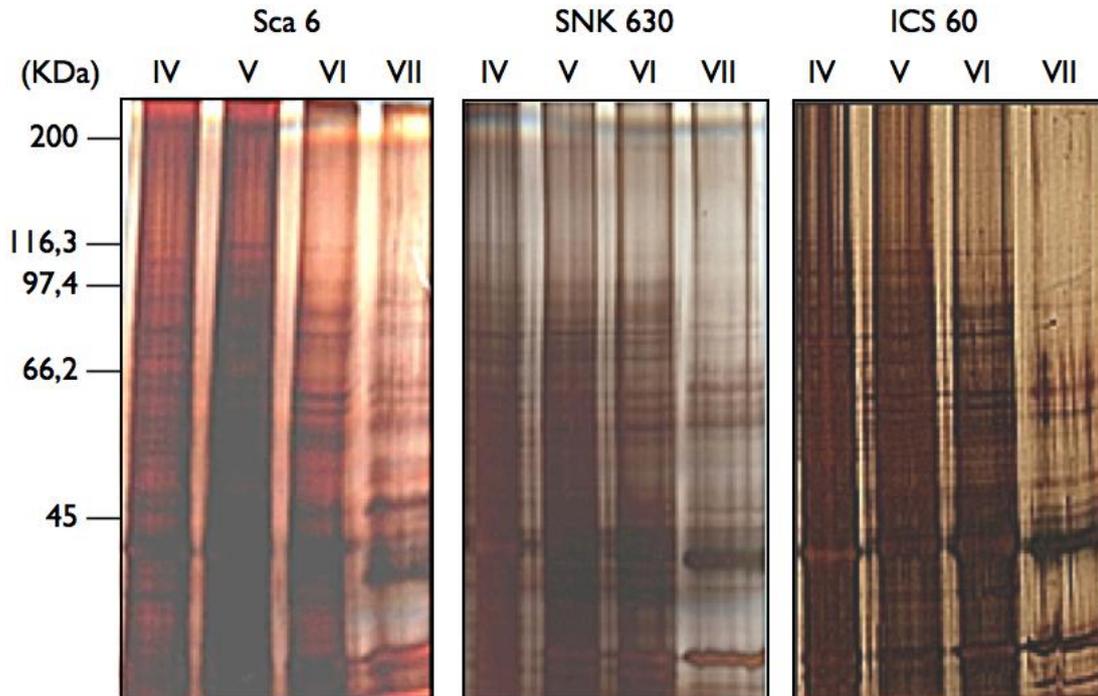


Figure 25 : Profil 1D SDS-PAGE des protéines extraites des embryons zygotiques aux stades IV, V, VI, VII pour les trois géotypes de cacaoyer Sca 6; SNK 630; ICS 60.

Quelque soit le génotype étudié, les profils protéiques obtenus pour les stades IV à V présentent une plus grande diversité de protéines par rapport à ceux observés aux stades VI à VII. Cette diversité décroît davantage du stade VI à VII (Fig. 25VI, VII). Quelque soit le génotype étudié, les bandes protéiques de masse moléculaire supérieure à 110 kDa sont peu nombreuses (Fig. 25). Par ailleurs, certaines bandes correspondant à des masses moléculaires (MM) comprises entre 35 et 40 kDa montrent des taux d'expression importants, et ceci quelque soit le stade de développement. Les polypeptides, dont la MM va de 35 et 90 kDa, présentent une expression différentielle et tendent à disparaître au stade VII. Les profils protéiques des embryons des différents génotypes ne permettent pas de les différencier. Ils montrent cependant qu'il existe des différences entre les stades de développement.

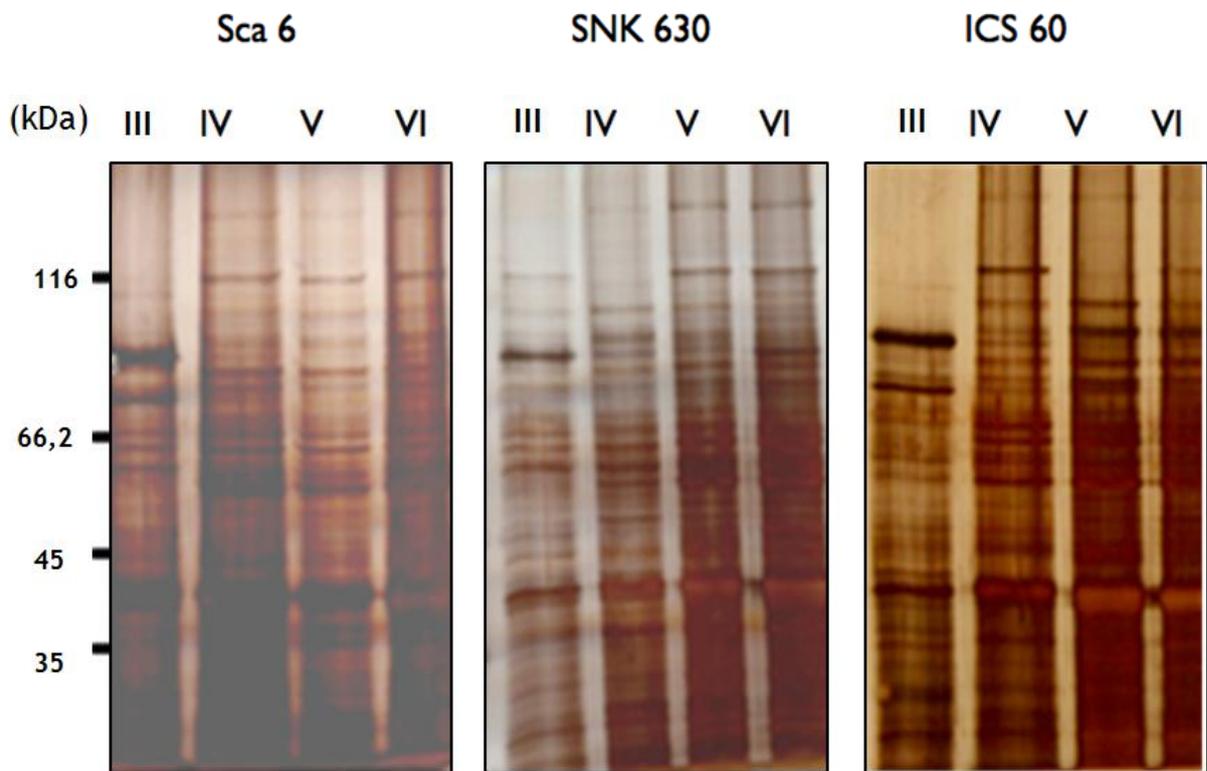


Figure 26 : Profil 1D SDS-PAGE des protéines extraites de l'albumen des embryons zygotiques aux stades III, IV, V, VI pour les trois génotypes de cacaoyer Sca 6; SNK 630; ICS 60.

L'analyse comparée des profils électrophorétiques de l'albumen des génotypes Sca 6, SNK 630 et ICS 60 montrent quelques particularités par rapport à ceux des embryons zygotiques (Fig. 26).

De prime abord, une bande de ~130 kDa est détectée dans l'albumen des différents génotypes, uniquement pour les stades cotylédonaire de IV à VI. Cette bande, absente au stade III, n'était pas détectée dans les embryons zygotiques. De manière générale, la plus faible diversité de

profil protéique est observée au stade III. Comme dans les embryons, les bandes peptidiques correspondantes à 35 et 40 kDa sont intensément exprimées pour tous les stades de développement embryonnaire. Seule la bande correspondant à ~107 kDa présente une expression différentielle au cours du développement permettant de discriminer les différents génotypes. Chez Sca 6, elle est absente au stade III, mais elle est présente aux stades IV à VI. Chez SNK 630, elle est absente uniquement au stade IV et présente dans les autres stades. Chez ICS 60 elle est absente au stade III, présente de IV à VI mais très faiblement exprimée au stade V.

Cette analyse du protéome montre que la technique 1D SDS-PAGE, bien qu'informatrice, ne permet pas de discriminer les 3 clones de cacaoyer. Cependant, cette technique semble suffisante pour dissocier les 3 clones lorsque l'on analyse non pas l'embryon, mais l'albumen. Ce qui pourrait d'ailleurs expliquer l'effet «génotype» récurrent observé au cours de l'embryogenèse somatique. On peut également noter une évolution du profil protéique au cours du développement. Au cours de cette première partie du travail, nous arrivons à la conclusion, que les différences génotypiques semblent hors de notre portée au regard des outils déployés dans cette étude. Nous avons de ce fait concentré nos efforts sur l'analyse plus approfondi d'un des 3 génotypes de cacaoyer : SNK 630 qui est une sélection originaire du Cameroun.

II. EVOLUTION DU PROTEOME ET DU GLYCOPROTEOME AU COURS DE L'EMBRYOGENESE ZYGOTIQUE ET SOMATIQUE CHEZ LE CACAOYER, SNK 630

Les ArabinoGalactanes Protéines (AGPs) sont des protéoglycanes glycosylés du règne végétal qui forment une fraction du glycoprotéome. Elles sont régulées au cours de l'ontogenèse de la plante (Rumyantseva et al., 2005). Ces molécules présentes dans plusieurs compartiments cellulaires, les mucilages et les sécrétions, sont également retrouvées dans le milieu de culture des suspensions cellulaires et dans l'albumen (Sutherland et al., 2004). L'implication des AGPs dans la régulation de l'embryogenèse somatique et zygotique a été établie. Elles sont identifiées comme activatrices de l'embryogenèse somatique. Les AGPs sont comparables aux protéoglycanes d'origine animale telle que l'héparine à la fois en terme de structure et de fonction (Rumyantseva et al., 2005). L'héparine, protéoglycane dont la sulfatation modifie la structure 3D de la molécule, est, tout comme les AGPs impliquée et régulée au cours du développement. Au regard de l'importance de la sulfatation des protéoglycanes, et consécutivement aux observations faites par Minyaka et al. (2008) quant à l'impact des sulfates sur l'induction des embryons somatiques chez le cacaoyer, une attention toute particulière a été portée à la recherche et l'identification des AGPs sulfatées.

Avant d'étudier, la ou les AGPs exprimées aux cours de l'embryogenèse zygotique et somatique, une étude de l'évolution du protéome et du glycoprotéome a été réalisée au cours de l'embryogenèse du clone SNK 630 de cacaoyer.

II.1. Etude du protéome des embryons du clone SNK 630

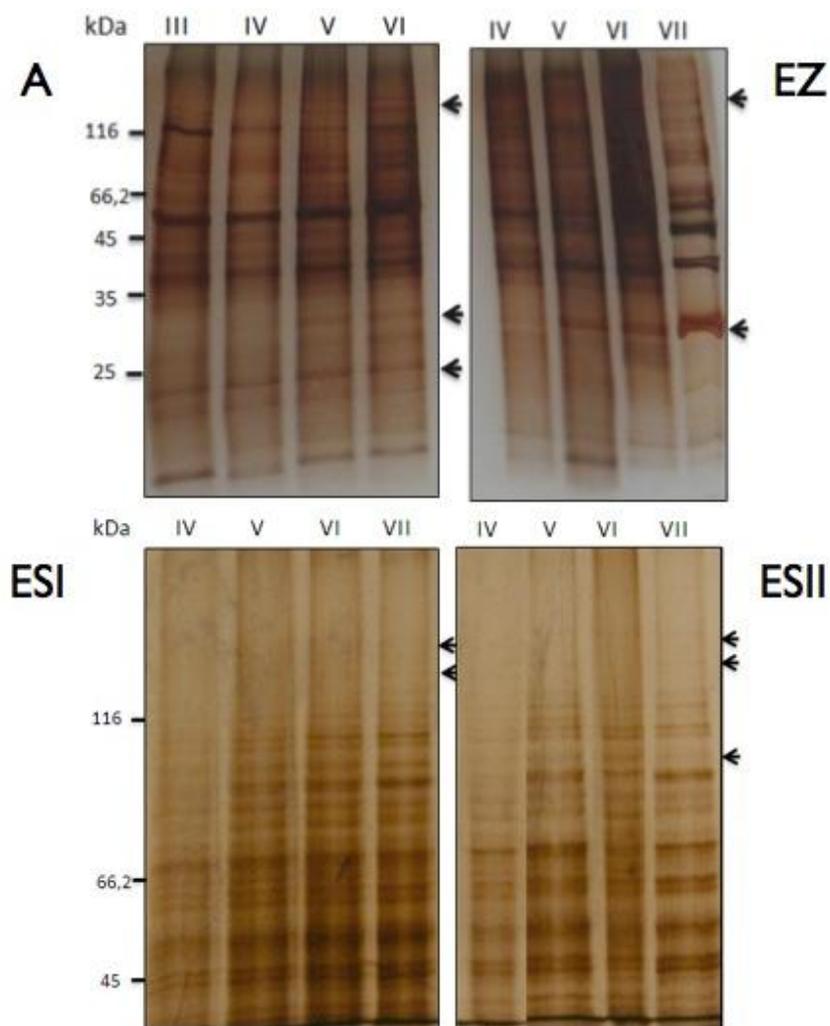


Figure 27 : Profil électrophorétique 1D SDS-PAGE d'extraits de protéines de *Theobroma cacao*, génotype SNK 630. Les protéines sont révélées par AgNO₃. (A), Albumen aux stades de développement embryonnaire III à VI ; (EZ), Embryons zygotiques des stades de développement embryonnaire IV à VII. Profil électrophorétique 1D SDS-PAGE sur gel à 8% d'extraits de protéines de *Theobroma cacao*, génotype SNK 630. (ESI), Embryons somatiques primaires des stades de développement embryonnaire IV à VII ; (ESII), Embryons somatiques des stades de développement embryonnaire IV à VII. Flèches, protéines présentant une expression modifiée.

Les protéines ont été séparées sur gel à gradient 8-16% 1D SDS-PAGE permettant d'identifier d'une part les protéines de haut poids moléculaire et d'autre part les peptides de faible poids moléculaire. Le nombre de bandes révélées au nitrate d'argent est supérieur à 25 aussi bien dans l'albumen que dans l'embryon (Fig. 27A, EZ). Nos résultats sont en accord avec les travaux de Noah et al. (2013), qui ont montré que 33 protéines étaient fortement exprimées dans l'embryon

zygotique de cacaoyer. Une expression différentielle est observée à différent stade de développement aussi bien dans l'albumen et dans l'embryon zygotique (Fig. 27A, EZ).

Sans pouvoir identifier la ou les protéines différentiellement exprimées au cours de l'embryogenèse pour le clone SNK 630, d'autres auteurs, comme Emile et al., (2007) ont mis en évidence une modification de l'expression de certaines protéines comme la cystéine synthase (~30 kDa) dans l'albumen et dans les embryons zygotiques, au cours du développement embryogène pour les génotypes Sca 6 et SNK 10. Au regard des masses moléculaires des AGPs, une attention toute particulière a été portée aux protéines de haut poids moléculaire exprimées dans l'albumen et/ou l'embryon (Fig. 27). Dans l'albumen, deux protéines de ~130 et ~150 kDa apparaissent dès le stade V (Fig. 27A). Ces protéines ne trouvent pas d'équivalent dans les embryons et semblent donc résulter d'une expression spécifique au sein de ce tissu nourricier. Fait intéressant, il a été démontré l'existence dans les milieux de culture et/ou dans les tissus de réserve de protéines pouvant faciliter l'embryogenèse.

Des protéines extraites d'embryons somatiques primaires et secondaires ont été ensuite séparées sur gel 1D SDS-PAGE à 8 %. Environ 15 bandes protéiques ont été détectées (Fig. 27ESI, ESII). Les profils protéiques obtenus montrent peu de différences entre les embryons somatiques primaires et secondaires et ceci quelque soit le stade développement de ces derniers. On notera cependant, que le stade IV présente la plus faible diversité protéique en comparaison des autres stades de développement (Fig. 27ESI, ESII). Même si la comparaison des profils protéiques entre les embryons zygotiques (Fig. 27EZ) et somatiques (Fig. 27ESI, ESII) ne peut être totalement satisfaisante, au regard des différentes techniques utilisées, on peut relever que le stade IV, pour le zygotique (Fig. 27EZ), n'est pas aussi pauvre en protéines que le stade similaire chez le somatique primaire ou secondaire (Fig. 27ESI, ESII). Il semble donc qu'au niveau des profils d'expression des protéines il existe des différences de niveau d'expression entre le zygotique et le somatique. Nos résultats sont en accord avec ceux de la littérature qui démontrent, chez le cacaoyer, l'existence de différences d'expression des protéines entre les embryons zygotiques et somatiques (Noah et al., 2013). Si les bandes peptidiques de masse inférieure à 116 kDa présentent une expression similaire dans les embryons du stade V au stade VII, les protéines de plus de 120 kDa, bien que peu exprimées, semblent apparaître avec la différenciation des embryons somatiques (Fig. 27ESI, ESII). Ici encore, des différences entre les profils d'expression du zygotique par rapport au somatique peuvent être mises en évidence. Chez le somatique, on observe l'apparition de bandes nouvelles de haut poids moléculaire pour les stades de développement les plus avancés. Le profil protéique des embryons zygotiques dont

les extraits sont séparés dans les mêmes conditions que les embryons somatiques (Fig. 25 SNK 630) montre que ces bandes de haut poids moléculaire sont moins détectées dans les embryons zygotiques. Cette différence de détection serait liée à la nature de ces protéines.

L'analyse de protéome 1D, pour le génotype SNK 630 de *Theobroma cacao*, met en évidence des différences entre les protéines exprimées dans les embryons zygotiques, somatiques primaires et somatiques secondaires. Cependant, malgré les différences morphologiques importantes observées entre ces 3 types d'embryons, nous n'avons pas réussi à mettre en évidence des différences importantes du protéome total avec cette technique. Sachant que la fraction glycoprotéique représente un pool de protéines significatives, à la fois en terme de fonction et de diversité, nous avons mis en place une démarche d'analyse d'une fraction de ce glycoprotéome au travers d'une analyse de l'expression des O-glycoprotéines.

II.2. Analyse du glycoprotéome des embryons du clone SNK 630

A l'instar des travaux menés sur le protéome total, nous avons cherché à suivre l'évolution des glycoprotéines et plus particulièrement des O-glycoprotéines de type protéoglycane ou AGP à la fois dans l'albumen (Fig. 28A), dans les embryons zygotiques (Fig. 28EZ) et somatiques (Fig. 28ESI, ESII) au cours du développement embryonnaire. Les glycoprotéines ont été caractérisées, dans un premier temps, *via* l'utilisation de la coloration acide périodique/réactif de Schiff (PAS) permettant de visualiser non pas la fraction protéique, mais la fraction glycanique des glycoprotéines. Les glycanes, qu'ils soient liés par une liaison N- ou O-glycosidique, apparaissent alors sous la forme d'une coloration rose due à la fixation du réactif de Schiff sur les fonctions aldéhydes formées sous l'action de l'acide périodique.

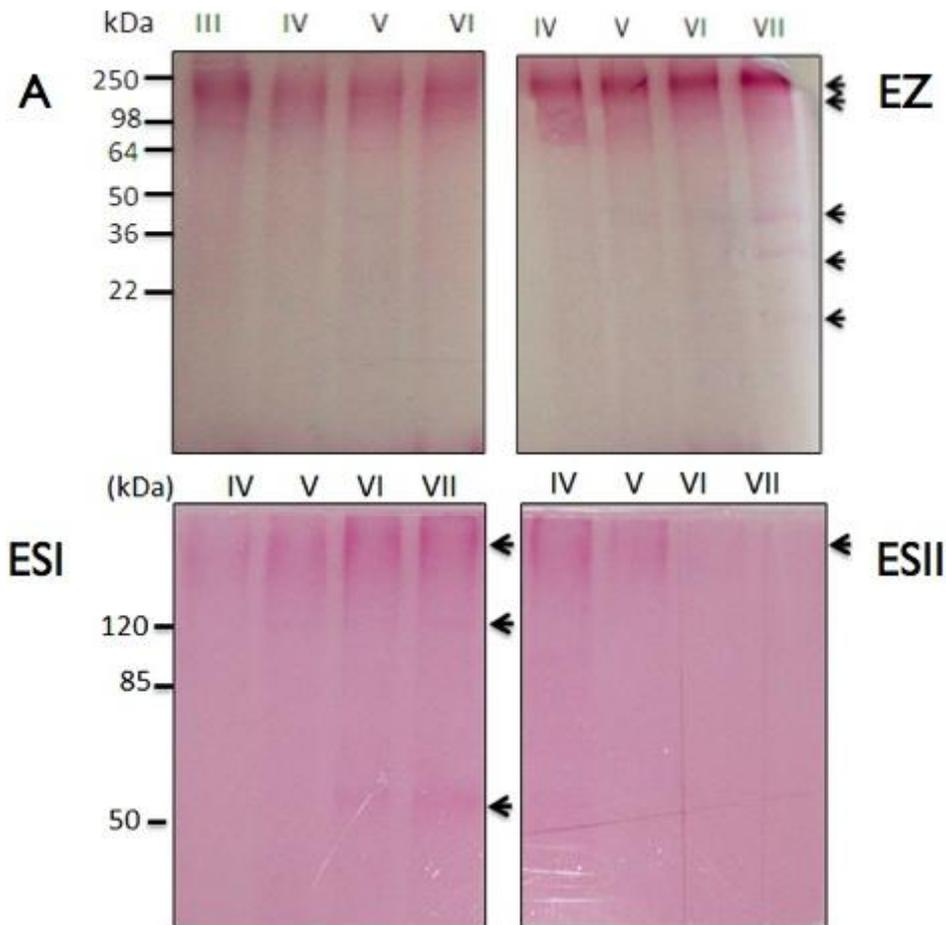


Figure 28 : Profil électrophorétique 1D SDS-PAGE sur gel à 8% de glycoprotéines de *Theobroma cacao* génotype SNK 630. Les glycoprotéines ont été révélées par l'acide périodique/réactif de Schiff (PAS). (A), Albumen aux stades de développement embryonnaire III à VI ; (EZ), Embryons zygotiques des stades de développement embryonnaires IV à VII ; (ESI), Embryons somatiques primaires des stades de développement embryonnaires IV à VII ; (ESII), Embryons somatiques des stades de développement embryonnaire IV à VII. Flèches, protéines présentant une expression modifiée.

Malgré la faible sensibilité de cette technique, des glycoprotéines de haut poids moléculaire ont été mises en évidence dans l'albumen (Fig. 28A), dans les embryons zygotiques (Fig. 28EZ) et dans les embryons somatiques primaires (Fig. 328ESI, ESII) et ceci quelque soit le stade de développement embryonnaire analysé. Pour les embryons somatiques secondaires, les glycoprotéines de haut poids moléculaires ne sont détectables que dans les 2 premiers stades de développement (Fig. 28ESII). Les AGPs, protéoglycanes constituées d'une fraction O-glycosidique représentant ~90% de la masse de la glycoprotéine native, sont susceptibles de former tout ou partie des molécules de haut poids moléculaire identifiées par cette coloration. Mais, plus encore que les glyco-conjugués de haut poids moléculaire, cette technique nous permet d'identifier des protéines de masse moléculaire plus faible, marqueurs possibles de N-glycoprotéines et/ou de O-glycoprotéines n'appartenant probablement pas au groupe des

protéoglycanes. Au regard de la taille de la fraction glycanique et de la sensibilité de la technique, l'intensité de la coloration rose observée suggère l'existence de nombreuses glycoprotéines. Cette première analyse suggère donc l'existence de 2 pools de glycoprotéines : (i) un pool de haut poids moléculaire constitué probablement de O-glycoprotéines de type protéoglycane et (ii) un pool de bas poids moléculaire dont on peut émettre l'hypothèse qu'il est formé par des N-ou des O-glycoprotéines différentes des protéoglycanes. Si le premier pool ne semble pas différentiellement régulé au cours de l'embryogenèse zygotique (Fig. 28), le second lui évolue avec la maturation des embryons (Fig. 28). Cependant, pour le pool de protéoglycanes les variations d'intensité des colorations, révélée par le réactif de Schiff, laisse suggérer une différence quantitative quant à la composition en protéoglycanes dans les embryons.

L'analyse du glycoprotéome total, même réalisée avec une technique peu sensible, fait apparaître des différences d'expression entre des protéines N- et O-glycosylées, suggérant l'importance de ce pool de protéines au cours de l'embryogenèse. Afin de préciser plus encore la nature de la fraction des glycoconjugués de haut poids moléculaire, une seconde coloration a été appliquée sur les protéines extraites de l'albumen, des embryons zygotiques et somatiques, primaires et secondaires.

II.3. Analyse de la fraction protéoglycanique dans les embryons du clone SNK 630

Une technique de coloration des protéoglycanes, la coloration au bleu alcian, a été utilisée afin d'en préciser mieux encore la nature (Fig. 29). Les arabinogalactanes protéines (AGPs), à l'instar des protéoglycanes, sont des glyco-molécules de haut poids moléculaire essentiellement composées de longues chaînes de monosaccharides pouvant contenir des acides glucuroniques, voir des groupements sulfatés (Serpe et al., 1996). Le bleu alcian, constitué de phtalocyanine avec un atome de cuivre, va interagir après ionisation à pH 2,5 avec les fonctions carboxyliques des acides uroniques. Pour des pH plus acides (pH 1), les groupes sulfoniques plus acides encore vont s'ioniser permettant ainsi l'interaction du chromophore avec les protéoglycanes. Une bande de protéoglycanes a été identifiée aussi bien dans l'albumen (Fig. 29A), que dans les embryons zygotiques (Fig. 29EZ). Pour ce qui est des embryons somatiques primaires et secondaires, la coloration au bleu alcian ne permet pas d'isoler une bande, mais montre un "smir" de coloration (Fig. 29ESI, ESII). Les bandes de hauts poids moléculaire précédemment identifiées avec le réactif de Schiff (Fig. 28A, EZ) ont été colorées également avec le bleu alcian (Fig. 29A, EZ) confirmant la présence de protéoglycanes végétaux dans l'albumen et les embryons zygotiques.

Plus encore, la technique de coloration utilisée ici suggère que les protéoglycanes de l'albumen et des embryons de cacao sont riches en groupement sulfate. Que ce soit pour l'albumen et les embryons zygotiques les protéoglycanes sulfatés sont présents à tous les stades de développement des embryons. Pour ce qui est des embryons somatiques primaires et secondaires, la coloration au bleu alcian montre la présence probable de nombreuses molécules différentes (smir) dont les poids moléculaires sont proches les uns des autres (Fig. 29ESI, ESII). Le profil obtenu avec le réactif de Schiff (Fig. 28 ESI, ESII) présentait déjà un léger "smir", confirmant ainsi que les 2 types de colorations permettent d'identifier, dans la gamme des hauts poids moléculaires, des protéoglycanes chez le cacao. Basée sur la détection de la fraction glucidique, cette technique de révélation montre des différences d'intensité de coloration entre les protéoglycanes de l'albumen et des embryons.

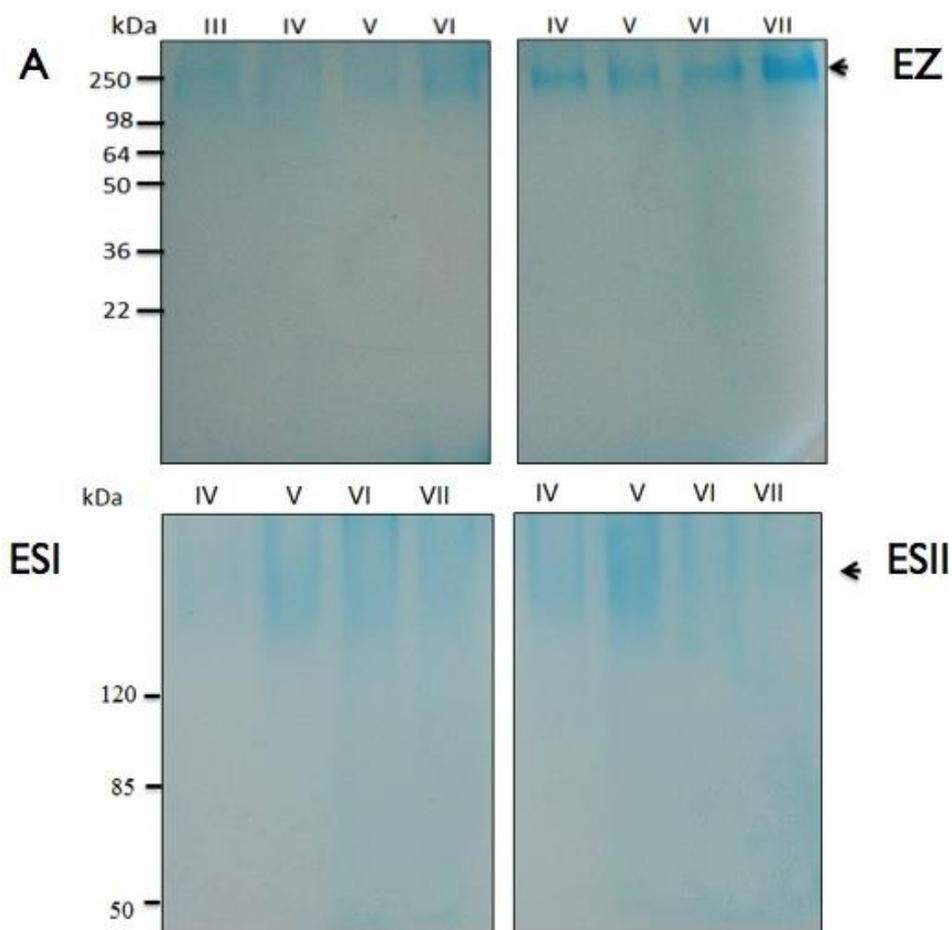


Figure 29 : Profil électrophorétique 1D SDS-PAGE sur gel à 8% de protéoglycanes de *Theobroma cacao*, génotype SNK 630. Les protéoglycanes ont été révélées au bleu alcian pH 1. (A), Albumen aux stades de développement embryonnaires III à VI ; (EZ), Embryons zygotiques des stades de développement embryonnaires IV à VII ; (ESI), Embryons somatiques primaires des stades de développement embryonnaires IV à VII ; (ESII) Embryons somatiques des stades de développement embryonnaires IV à VII. Flèches, protéines présentant une expression modifiée.

La technique PAS, associée au bleu alcian, permet de mettre en évidence des différences importantes quant à la distribution de cette classe de molécules entre les embryons zygotiques et somatiques. Ici encore, la fraction glycoprotéique permet de discriminer l'albumen, mais surtout les stades de développement des embryons zygotiques et somatiques primaires et secondaires. Cette coloration suggère la présence de protéoglycanes sulfatés, ou AGPs sulfatés dans les embryons de cacaoyer.

III. IDENTIFICATION, PURIFICATION ET CARACTERISATION DES D'AGPs AU COURS DE L'EMBRYOGENESE ZYGOTIQUE ET SOMATIQUE CHEZ LE CACAOYER, SNK 630

Après avoir confirmé la présence de glycoprotéines de type protéoglycane, différenciellement exprimées au cours du développement embryonnaire chez le cacaoyer clone SNK 630, nous avons cherché à préciser plus encore la nature biochimique des molécules de haut poids moléculaire détectées. Chez les végétaux, les arabinogalactanes protéines forment une famille multigénique de O-glycoprotéines, dont les caractéristiques physico-chimiques globales sont très homogènes rendant difficile leur purification et leur analyse individuelle. Parmi les techniques usuelles d'analyse des AGPs, le β -D-glucosyl Yariv permet d'isoler les AGPs par précipitation facilitant, ainsi leur détection, leur quantification voir leur purification. Avant d'identifier et d'analyser les AGPs du cacaoyer, nous avons synthétisé du β -D-glucosyl Yariv dont l'efficacité sera testée sur de la gomme arabique d'Acacia.

III.1. Synthèse du β -D-glucosyl Yariv

Le β -D-glucosyl Yariv (Fig. 30) est un phénylglycoside qui se lie sélectivement par des liaisons non covalentes aux AGPs pour former des agrégats qui précipitent. La liaison des AGPs au β -D-glucosyl Yariv est réversible permettant ainsi son utilisation pour détecter, quantifier et purifier les AGPs. Le β -D-glucosyl Yariv ou le 1,3,5-tris-(4- β -D-glucopyranosyloxyphénylazo)-2,4,6-

trihydroxy-benzène est synthétisé en deux étapes à partir du 4-aminophényl β -D-glucopyranoside. La première étape est la formation d'un sel de diazonium par réaction du groupement amino avec le nitrite de sodium en milieu acide. Le sel de diazonium étant instable, il est mis directement à réagir, à froid, avec le phloroglucinol. Le produit final est obtenu par substitution électrophile sur aromatique (Fig. 30). Ce dernier est isolé par précipitation.

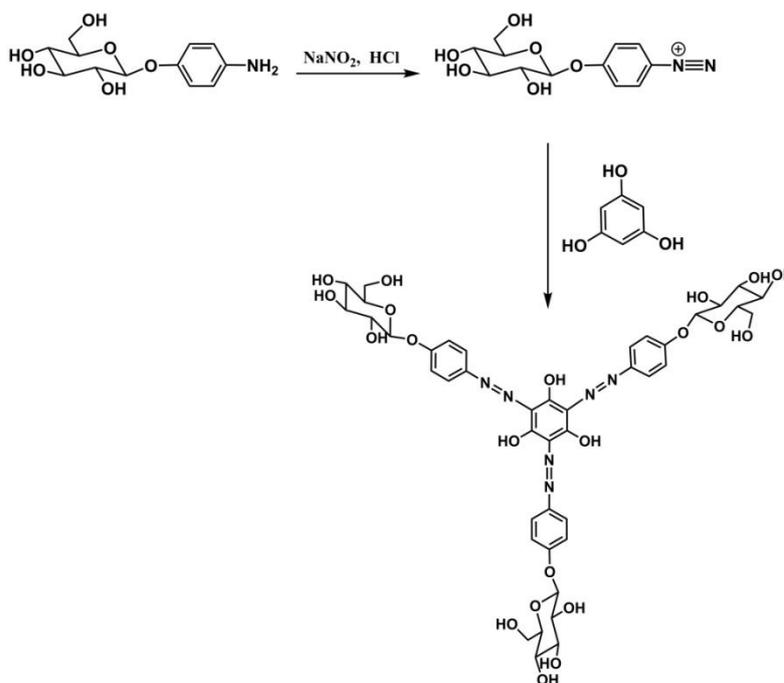


Figure 30 : Schéma de synthèse du β -D-glucosyl Yariv.

Le produit obtenu, avec un rendement global de 91,11%, a été analysé par résonance magnétique nucléaire (RMN). Le spectre de RMN du proton permet de distinguer les protons anomériques à 4,92 ppm sous forme de doublet avec un couplage de 7,1 ppm, confirmant la forme β du glycosyle. Les protons aromatiques sont sous forme de deux doublets à 7,66 ppm et 7,18 ppm avec un couplage de 8,6 Hz. Les protons du sucre résonnent entre 3,19 ppm et 3,72 ppm (Fig. 31).

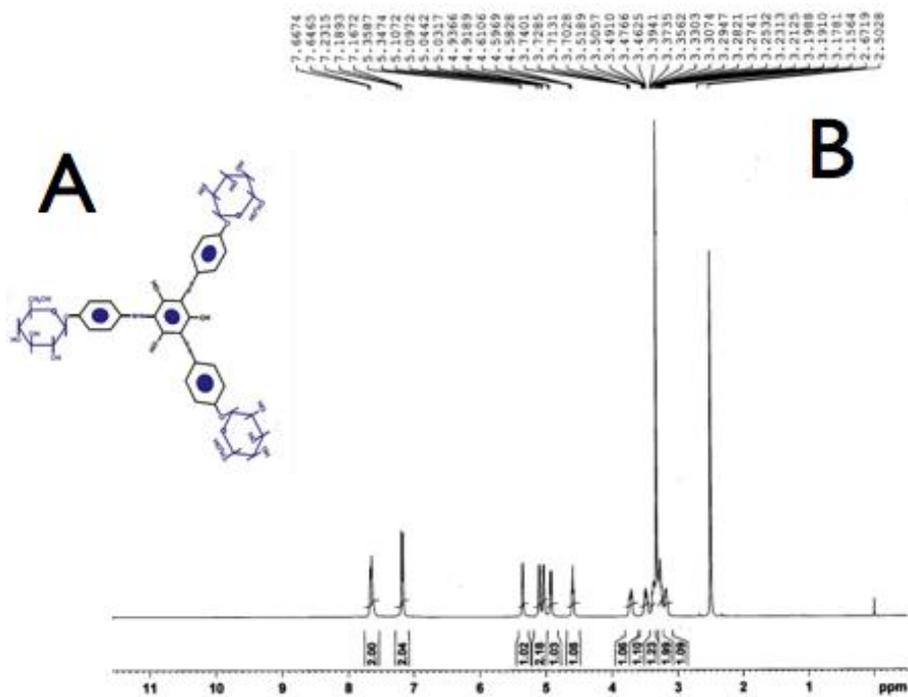


Figure 31 : β-D-glucosyl Yariv, A structure, B, Spectre RMN.

Analyse RMN ¹H DMSO-d₆ : 7,66 ppm (d, J=8,6 Hz, 6H Aromatiques); 7,18 ppm (d, J=8,6 Hz, 6H Aromatiques); 4,92 ppm (H-1, d, J=7,1Hz, 3H) ; 3,19-3,50 ppm (m, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6_a, 15H), 3,72 ppm (H-6_b,dd, J=4,4 Hz, J=10,80 Hz, 3H).

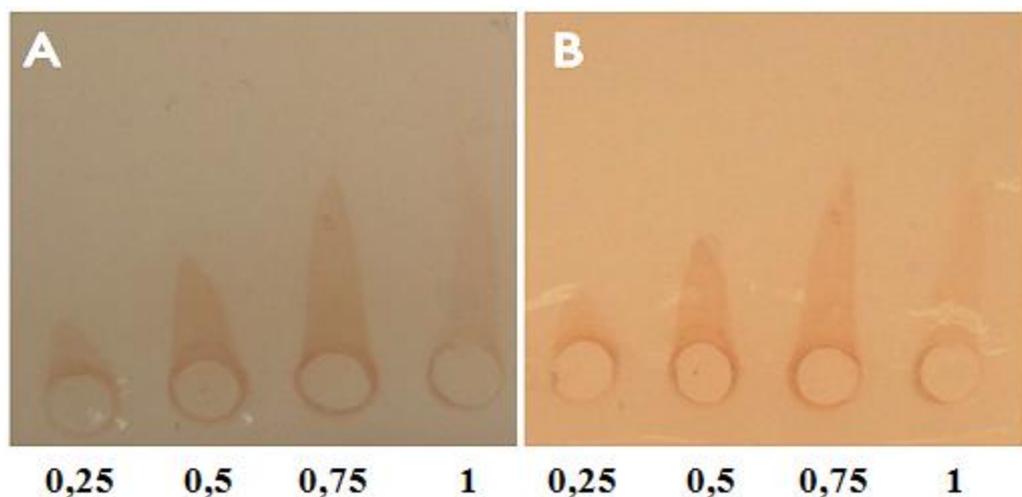


Figure 32 : Electrophorèse sur gel d'agarose contenant : (A), 15 μM β-D-glucosyl Yariv commercial ; (B) 15 μM de β-D-glucosyl Yariv préparé au laboratoire. Des concentrations croissantes (0,25-1μg) d'AGP de gomme arabique d'acacia ont été utilisées.

Le réactif de β-D-glucosyl Yariv synthétisé a été testé contre des AGP issus de la gomme arabique d'acacia (Fig. 32) avant d'être utilisé pour quantifier, puis purifier les AGPs du cacaoyer. Les AGPs de la gomme arabique d'Acacia ont été séparées par électrophorèse sur gel

d'agarose à 1% contenant 15 μM $\beta\text{-D}$ -glucosyl Yariv commercial (Fig. 32A) ou 15 μM de $\beta\text{-D}$ -glucosyl Yariv préparé au laboratoire (Fig. 32B). Après plusieurs heures de migration, les rockets ont été quantifiés et le réactif commercial a été comparé avec notre préparation. Le $\beta\text{-D}$ -glucosyl Yariv commercial.

III.2. Détection des AGPs dans les embryons du clone SNK 630

La double coloration, bleu de coomassie et $\beta\text{-D}$ -glucosyl Yariv a été utilisée pour détecter les AGPs dans l'albumen (Fig. 33A), dans les embryons zygotiques (Fig. 33EZ) et dans les embryons somatiques primaires et secondaires (Fig. 33ESI, ESII). Seules les bandes peptidiques de haut poids moléculaire dans l'albumen et les embryons zygotiques, précédemment colorées au PAS (Fig. 28A, EZ) et au bleu alcian (Fig. 29A, EZ), sont colorées en brun par le $\beta\text{-D}$ -glucosyl Yariv à la fois dans l'albumen (Fig. 33A) et dans les embryons zygotiques (Fig. 33EZ).

Les autres protéines apparaissent ici en bleu, coloration due à la fixation du bleu de coomassie sur les peptides (Fig. 33). La coloration des protéines au $\beta\text{-D}$ -glucosyl Yariv est, elle, spécifique d'une fraction des O-glycoprotéines, les AGPs. Cependant, les AGPs sont une famille des protéoglycanes dont les variations de masse moléculaire sont faibles, ne nous permettant pas, même sur un gel à gradient, d'observer plusieurs bandes protéiques. Les variations d'intensité de la bande de haut poids moléculaire, après coloration au $\beta\text{-D}$ -glucosyl Yariv différent, suggèrent une régulation de l'expression du pool d'AGPs au cours du développement embryonnaire. Ici encore, à l'instar des résultats déjà obtenus pour les embryons somatiques primaires et secondaires avec les colorations PAS (Fig. 28ESI, ESII) et bleu alcian (Fig. 29ESI, ESII), la double coloration ne permet pas d'identifier correctement dans le pool de protéines total des embryons la présence d'AGPs (Fig. 33ESI, ESII). Cependant, la qualité des gels présentés ne permet pas de conclure quant à la présence et/ou à l'absence d'AGPs dans les embryons somatiques. Néanmoins, il semble que les embryons somatiques sont moins riches en AGPs spécifiquement reconnues par le $\beta\text{-D}$ -glucosyl Yariv que l'albumen et les embryons zygotiques d'un même génotype de cacaoyer.

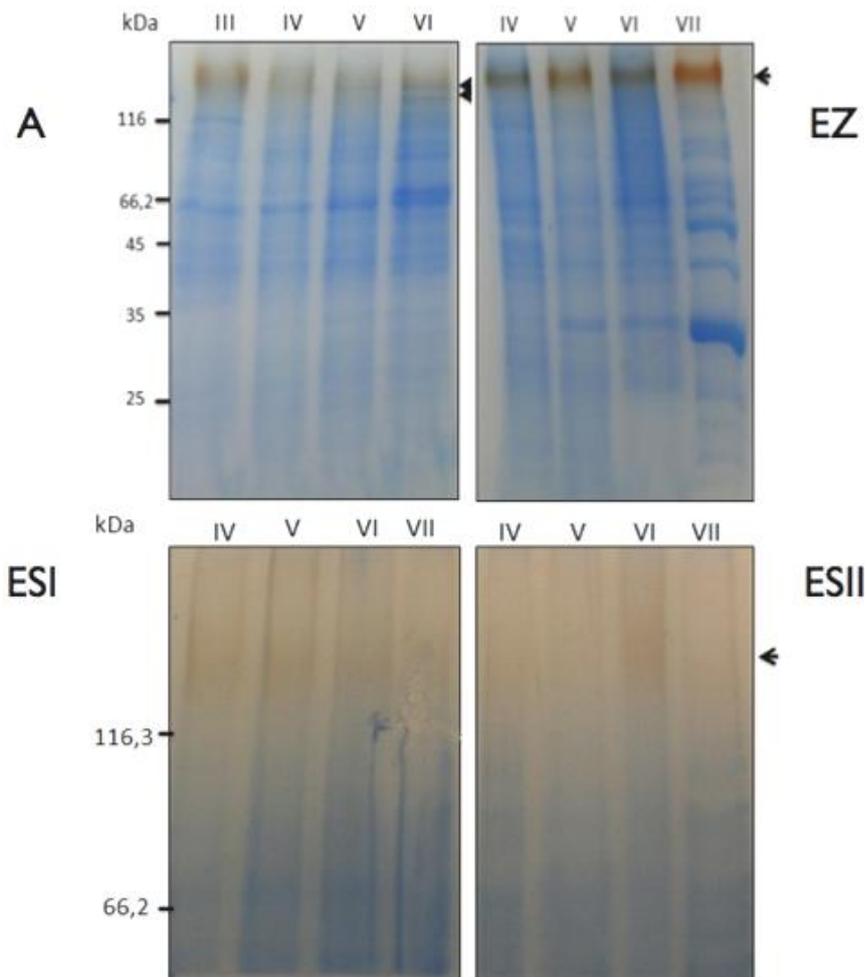


Figure 33 : Profil électrophorétique 1D SDS-PAGE sur gel à gradient (4-15) de protéines et d'AGPs de *Theobroma cacao*, génotype SNK 630. Les protéines sont révélées par la double coloration bleu de coomassie/ β -D-glucosyl Yariv. (A), Albumen aux stades de développement embryonnaire III à VI ; (EZ) Embryons zygotiques des stades de développement embryonnaire IV à VII. Profil électrophorétique 1D SDS-PAGE sur gel à 8% d'extraits de protéines de *Theobroma cacao*, clone SNK 630. (ESI), Embryons somatiques primaires des stades de développement embryonnaire IV à VII ; (ESII) Embryons somatiques des stades de développement embryonnaire IV à VII. Flèches, protéines présentant une expression modifiée

III.3. Quantification des AGPs dans l'albumen et lesembrions du génotype SNK 630

Les teneurs en AGPs ont été déterminées par immuno-précipitation des protéines sur gel d'agarose à 1% contenant du β -D-glucosyl Yariv, où la gomme arabique d'acacia sera utilisée comme standard. Pour le génotype SNK 630, l'évolution de ces teneurs a été déterminée dans les embryons somatiques primaires, dans les zygotiques du stade IV au stade VII et dans l'albumen du stade III au stade VI (Fig. 34). Dans l'albumen, la teneur en AGPs décroît du stade

III au stade V, puis augmente au stade VI où sa valeur est la plus élevée. La décroissance de la teneur en AGPs est également observée dans les embryons zygotiques et somatiques du stade IV au stade V. Cette teneur augmente au stade VI mais va diminuer au stade VII dans les deux types d'embryons. La teneur la plus élevée est observée au stade VI dans les embryons zygotiques, alors qu'elle se retrouve au stade IV dans les embryons somatiques.

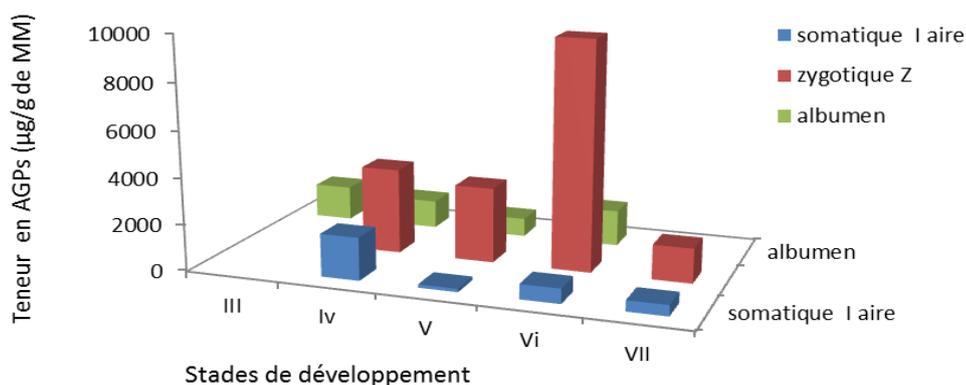


Figure 34 : Evolution de la teneur en β -D-glucosyl Yariv AGPs de *Theobroma cacao* L. dans l'albumen, les embryons zygotiques et somatiques pour les stades de développement III à VII. MF, Matière Fraîche.

Au final, et de manière générale la teneur en AGPs est plus importante dans les embryons zygotiques par rapport aux embryons somatiques. Les teneurs faibles des AGPs dans les embryons somatiques seraient à l'origine de la faible détection observée avec les différentes techniques de révélation utilisées dans cette étude (Fig. 29, 33). L'analyse de l'évolution quantitative de ces macromolécules dans l'albumen et les embryons zygotiques montre que leurs teneurs sont élevées pour les stades de développement correspondant à l'initiation de processus organogénétiques comme la formation des cotylédons. Ainsi, au stade IV, correspondant au début de la croissance des cotylédons, la teneur en AGPs est plus élevée qu'au stade V, caractérisé par des cotylédons déjà formés. Cette teneur augmente à nouveau après le stade V, avec le début de pigmentation des cotylédons, puis va baisser, au stade VII, lorsque les cotylédons seront complètement pigmentés. Cette évolution est observée aussi bien dans les embryons zygotiques que dans les somatiques, ce qui suggère l'implication des AGPs dans le développement des embryons indépendamment de leur origine cellulaire.

III.4. Purification des AGPs du milieu de culture et des embryons du génotype SNK 630

De par les similitudes des propriétés physico-chimiques des AGPs, la purification et l'analyse de chacune d'entre elles sont rendues difficiles. Ainsi, les techniques de séparation utilisées dans cette étude, comme l'électrophorèse 1D SDS-PAGE, ne sont pas suffisamment résolutive pour séparer chacune de ces protéines. Si ces techniques nous ont permis de démontrer la présence d'AGPs, voir d'AGPs sulfatées, dont l'expression globale est régulée au cours du développement embryonnaire, seules les techniques de chromatographie, combinée ou individuelle, peuvent permettre d'affiner la séparation de cette famille de molécules. Après précipitation des AGPs à l'aide du β -D-glucosyl Yariv, le pool d'AGPs, isolé des embryons zygotiques, somatiques, mais également du milieu de culture, a été séparé par différentes techniques de chromatographie comme la chromatographie en phase inverse ou la chromatographie d'exclusion stérique. Ces techniques doivent permettre de caractériser les AGPs du cacaoyer soit sur la base de leur hydrophobicité, soit au regard de leur masse moléculaire. Outre les techniques de séparation, plusieurs méthodes de détection des molécules chromatographiées ont été testées : (i) détection UV à 215 et 280 nm et fluorescence. Chez *Arabidopsis thaliana*, 15 AGPs différentes ont été mises en évidence, pour un organe donné, à partir d'AGPs précipitées par du β -D-glucosyl Yariv et séparées par chromatographie en phase inverse (Schultz et al., 2000). Dans ce travail, les AGPs sont détectées à 215 nm et à 280 nm. Cependant, quelque soit la longueur d'onde utilisée, la spécificité de ces méthodes de détection reste faible ce qui peut conduire à de nombreuses erreurs de mesure (problème de faux positif, de détection d'autres molécules que des protéines). Cependant, aucune des méthodes de détection utilisées ne permet d'identifier avec précision uniquement la fraction glycanique ou protéique. Ainsi, à 280 nm nous détecterons les liaisons conjuguées des protéines mais également de l'ADN (Simon et al., 2009). Il en est de même à 215 nm, où l'on détecte les liaisons peptidiques, mais également des chaînes aliphatiques. Seule la fluorescence semble la méthode de détection à la fois la plus précise permettant de suivre certains acides aminés constituant la fraction protéique et la plus sensible dans la mesure où l'on est capable d'identifier le couple longueur d'onde d'excitation et d'émission de la fluorescence. Cependant, quelque soit la méthode utilisée, il nous a paru important de suivre la fraction protéique en raison du polymorphisme important de la partie à glycane des AGPs.

III.4.1. Séparation des AGPs sur la base de leur propriété hydrophobe

Les AGPs, isolées des embryons zygotiques, somatiques et du milieu de culture du génotype SNK 630, ont été séparées sur la base de leur hydrophobicité/polarité par chromatographie liquide à haute performance, en phase inverse (CPI) suivant un gradient d'acétonitrile. Les empreintes chromatographiques ont été obtenues à 215 nm (Fig. 35) et à 280 nm (Fig. 36) permettant de distinguer plusieurs pics d'intensités différentes.

A 215 nm, 5 fractions se distinguent en fonction de leur degré d'hydrophobicité (Fig. 35A, B, C, D, E). La fraction A est éluée avec 0% d'acétonitrile et est constituée essentiellement par des molécules hydrophiles. La fraction B, qui semble être la fraction majoritaire quelque soit l'échantillon, est éluée avec 10% à 16% d'acétonitrile. La fraction C, éluée avec 19 et 25% d'acétonitrile, comporte deux pics de faible intensité qui ne sont cependant pas présents dans tous les échantillons. La fraction D est éluée avec 28 à 65% d'acétonitrile. Elle n'est cependant pas détectée dans tous les échantillons. La fraction E est la plus hydrophobe, elle est éluée avec 100% d'acétonitrile.

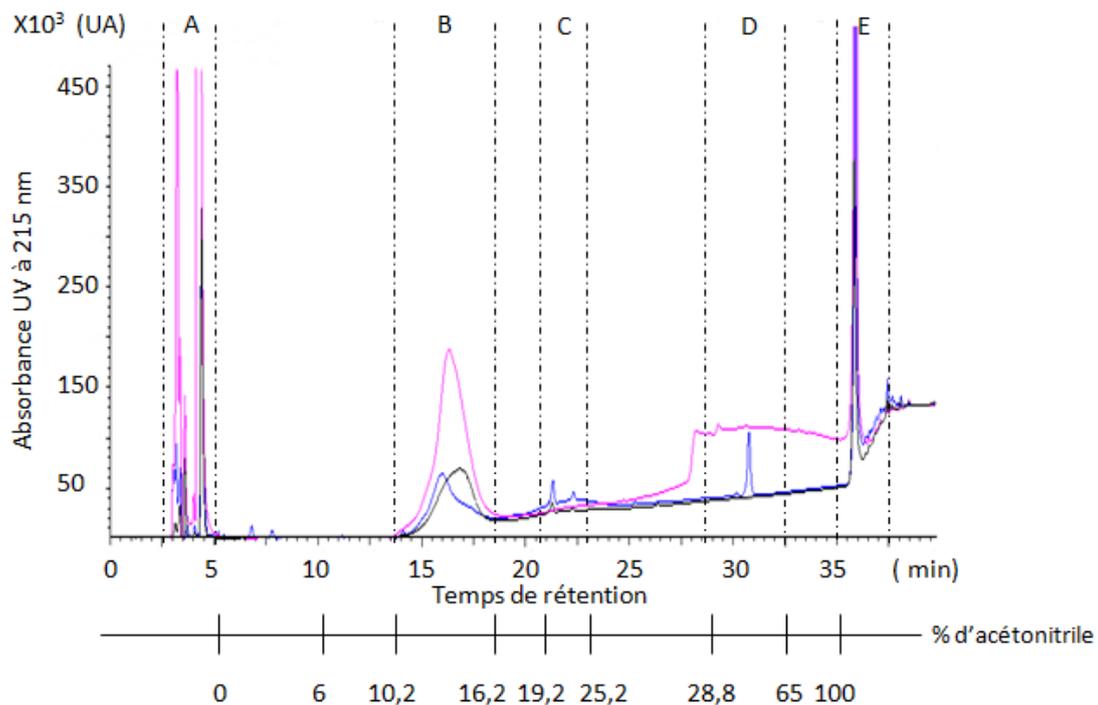


Figure 35 : Empreinte chromatographique en phase inverse avec détection à 215 nm d'AGPs de *Theobroma cacao* génotype SNK 630, précipitées par le β -D-glucosyl Yariv. (Rose), embryons zygotiques au stade VII ; (Bleu), embryons somatiques secondaires au stade VII ; (Noir), milieu de culture des embryons somatiques secondaires au stade VII.

L'analyse comparée des chromatogrammes des embryons zygotiques (Fig. 35 Rose) et somatiques du génotype SNK 630 au stade VII (Fig. 35 Bleu), et du milieu de culture (Fig. 35 Noir), montre qu'ils sont superposables et ne diffèrent que par le profil des fractions C et D.

À 280 nm, les profils chromatographiques présentent une évolution similaire, bien que plus hétérogènes (Fig. 36). La fraction B, déjà détectée à 215 nm (Fig. 35), se retrouve à la fois pour les embryons zygotiques et somatiques primaires, mais diffère pour ce qui est du milieu de culture. A l'instar de ce qui est observé à 215 nm, la fraction B est représentée par un pic large suggérant soit une molécule difficile à détacher de la matrice chromatographique, soit d'un mélange de molécules ayant des propriétés hydrophobes très proches. Les données obtenues ici sont en accord avec celles classiquement décrites dans la littérature (Schultz et al., 2000). Ces auteurs ont identifié et caractérisé, chez l'arabette des dames, une fraction similaire à notre fraction B. Pour certain organes, comme les racines d'*A. thaliana*, il est même possible de séparer plusieurs pics dans cette gamme de polarité de solvant. Par contre, la détection à 280 nm montre un pouvoir de résolution plus faible qu'à 215 nm.

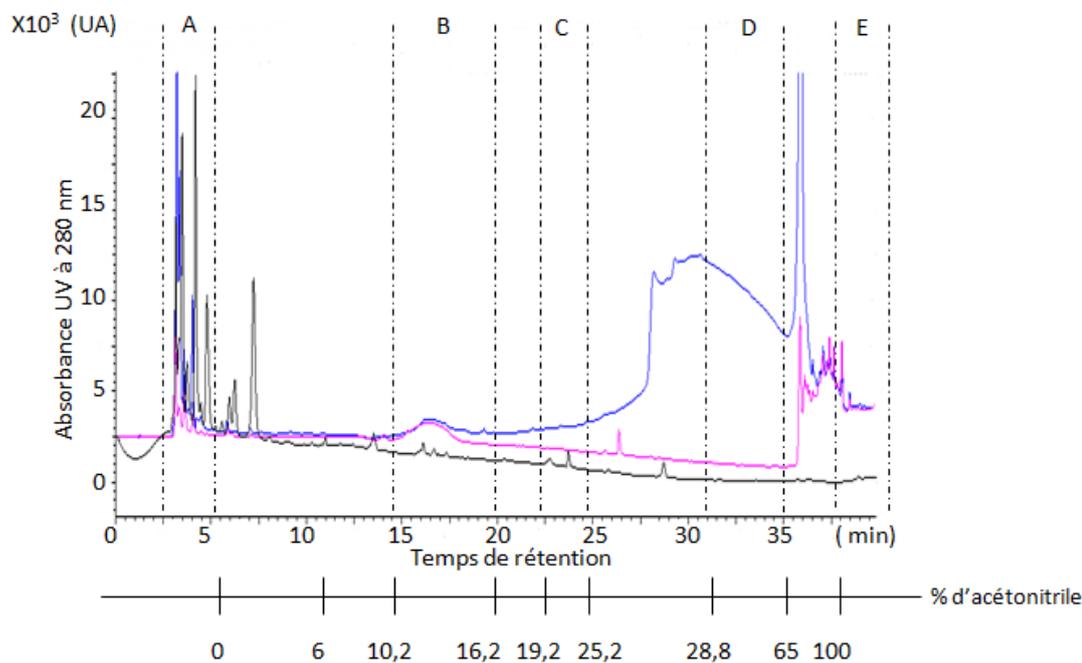


Figure 36 : Empreinte chromatographique en phase inverse avec détection à 280 nm d'AGPs de *Theobroma cacao* génotype SNK 630, précipitées par le β -D-glucosyl Yariv. (Bleu), embryons zygotiques au stade VII ; (Rose), embryons somatiques secondaires au stade VII ; (Noir), milieu de culture des embryons somatiques secondaires au stade VII.

La perte de résolution est telle que le pic observé à partir d'un extrait issu du milieu de culture, identifié à 215 nm n'est plus visible à 280 nm (Fig. 35, 36 Noir). Si cette fraction B correspond aux AGPs des embryons de cacaoyer, alors il semble logique d'observer une telle réduction de l'intensité du pic. En effet, les acides aminés aromatiques détectés à 280 nm sont peu nombreux dans la structure de la molécule.

Il semblerait donc, que cette technique de séparation couplée avec une détection à 280 nm ne soit pas la meilleure méthode d'analyse de fraction complexe d'AGPs de cacaoyer. Les techniques de détection des molécules chromatographiées ciblent la fraction peptidique. Les AGPs étant des O-glycoprotéines nous avons cherché à identifier la présence de sucre dans ces différentes fractions, et plus particulièrement dans la fraction B.

III.4.2. Caractérisation biochimique des fractions chromatographiées

Afin de rechercher la présence de sucres dans les différentes fractions séparées à la suite des chromatographies en phase inverse (Fig. 35, 36), une détermination rapide, par test couche mince, a permis de mettre en évidence que toutes les fractions, sauf la fraction A, contenaient des sucres (test à l'orcinol sulfurique, résultat non présenté dans ce manuscrit). De façon similaire, les fractions ont été testées quant à leur aptitude à précipiter en présence de β -D-glucosyl Yariv. Ici encore, le test s'est avéré positif pour toutes les fractions sauf la fraction A (résultat non présenté dans ce manuscrit). La fraction B serait la première fraction contenant des AGPs. Ce serait la fraction d'AGPs la plus glycosylée, dont les pics couvrent la plus grande surface, représentant les AGPs majoritaires des embryons de cacaoyer. Eluée entre 10 et 16% d'acétonitrile, cette fraction est la plus hydrophile. L'étalement des pics associé à un temps d'élution relativement long (5 min), traduirait, en plus de l'épaulement observé pour les embryons somatiques (Fig. 35 bleu), une hétérogénéité moléculaire. Schultz et al. (2000) ont d'ailleurs détectés, après déglycosylation, plusieurs molécules issues d'une seule des fractions d'AGPs séparées en phase inverse. La fraction, a fait alors l'objet d'une étude plus approfondie quant à sa composition monosaccharidique.

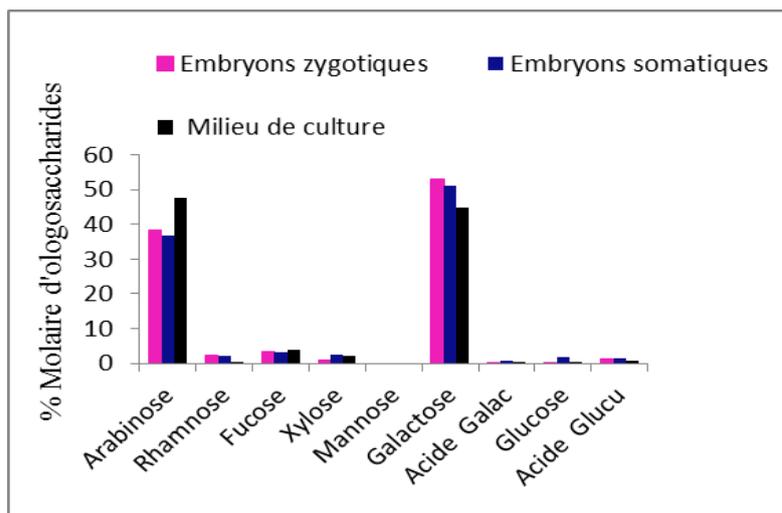


Figure 37 : Histogramme montrant le pourcentage molaire des monosaccharides identifiés dans la fraction B, obtenue après chromatographie en phase inverse d'un extrait de protéines précipitées par le β -D-glucosyl Yariv, chez *Theobroma cacao*, génotype SNK 630. Barre rose, Embryons zygotiques au stade VII ; Barre bleue, Embryons somatiques secondaires au stade VII ; Barre noire, Milieu de culture des embryons somatiques secondaires au stade VII.

La composition en monosaccharides de la fraction B (Fig. 35, 36) a été analysée par chromatographie liquide gaz. Les monosaccharides, triméthylsilylés, ont été séparés sous un flux d'azote et détectés par ionisation de flamme. Le pourcentage molaire des monosaccharides dans l'échantillon a été déterminé par rapport à une référence de concentration connue : le myo-inositol. Les monosaccharides majoritaires de la fraction B sont l'arabinose et le galactose confirmant l'existence d'un polymère d'arabinogalactane dans cette fraction (Fig. 37). La présence d'arabinogalactanes, la précipitation des molécules de cette fraction en l'aide de β -D-glucosyl Yariv, ainsi que l'identification de protéines détectées au travers de l'analyse chromatographique forment un faisceau d'arguments nous suggérant que les molécules identifiées dans la fraction B sont des AGPs de cacaoyer.

Tableau 3 : Rapport des pourcentages molaires d'arabinose et de galactose de la fraction B, détectée après séparation par chromatographie en phase gazeuse d'extraits protéiques précipités par le β -D-glucosyl Yariv, chez *Theobroma cacao* génotype SNK 630

Source d'AGPs	Rapport Ara/Gal
Embryons zygotiques au stade VII	0,72/1
Embryons somatiques secondaires au stade VII	0,72/1
Milieu de culture des embryons somatiques secondaires au stade VII	1,06/1

Outres les 2 monosaccharides majoritaires, on trouve également, par ordre décroissant, des traces de fucose, de rhamnose, de xylose et d'acide galacturonique. Le pourcentage molaire d'Ara est plus élevé dans le milieu de culture des embryons somatiques secondaires par rapport à ce qui est quantifié pour les embryons somatiques secondaires. L'analyse du rapport Ara/Gal montre qu'il est le même dans les embryons zygotiques et somatiques secondaires mais diffère cependant de celui du milieu de culture des embryons somatiques secondaires (Tableau 3). Si les AGPs identifiées dans les embryons somatiques secondaires présentent des polarités similaires aux AGPs sécrétées dans le milieu de culture, des différences quant à la composition en monosaccharides suggèrent l'existence d'au moins 2 pools d'AGPs : (i) un pool embryonnaire et (ii) un pool extra-embryonnaire secrété soit par les embryons au cours de leur développement, soit par le cal embryogène au cours de la culture.

Cependant, la technique de chromatographie utilisée dans cette première partie est à la fois peu résolutive et peu sensible, donc mal adaptée à la discrimination des AGPs ayant des propriétés d'hydrophobicités proches. Afin d'améliorer le pouvoir de résolution des techniques de chromatographie des AGPs de *Theobroma cacao*, génotype SNK 630, nous avons cherché à mettre au point une nouvelle méthode d'analyse basée sur la différence des masses moléculaires de ce groupe de molécules.

III.4.3. Séparation des AGPs sur la base de leur masse moléculaire

Les AGPs, purifiés par β -D-glucosyl Yariv, ont été séparées par chromatographie d'exclusion stérique couplée à 2 modes de détection des protéines : (i) UV à 215 nm et 280 nm et (ii) la fluorescence. Dans une première partie nous avons mis au point la technique de séparation à l'aide d'AGPs commerciales contenues dans la gomme arabique d'Acacia, vendue par Sigma-Aldrich, avant d'appliquer cette nouvelle technique de chromatographie sur les embryons zygotiques et somatiques de *T. cacao* génotype SNK 630.

III.4.3.1. Détermination des masses moléculaires des AGPs de la gomme arabique après chromatographie d'exclusion stérique

La gomme arabique est tout à la fois l'AGP la plus étudiée et la plus utilisée comme molécule de référence (Van Holst et Clark, 1985 ; López-Franco et al., 2012). Avant l'analyse des profils

chromatographiques d'AGPs de gomme arabique, les colonnes ont été calibrées dans un premier temps avec une gamme de polysaccharides de masse moléculaire croissante (50 à 500 kDa) et avec des protéines de référence (13 à 670 kDa).

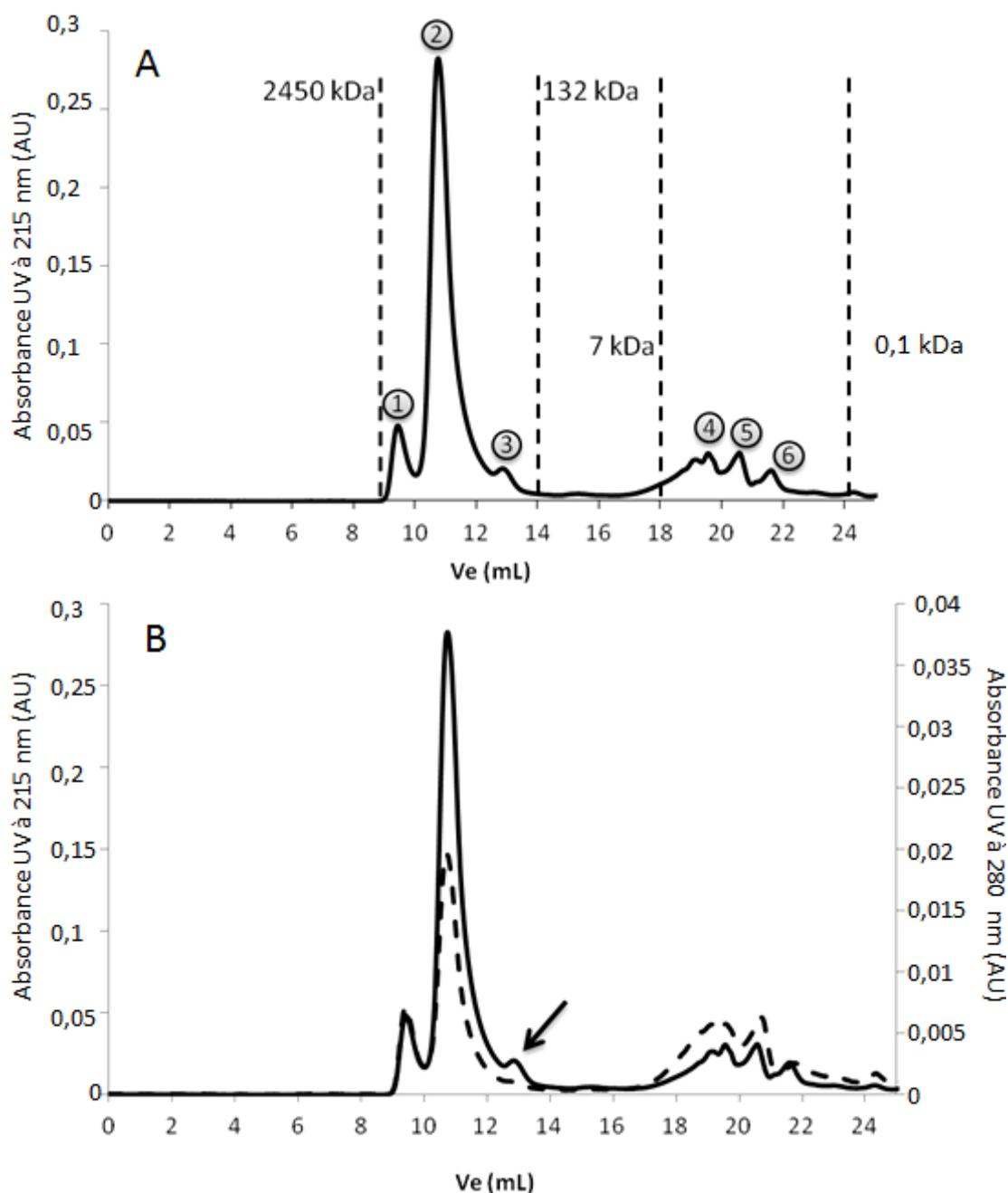


Figure 38 : Profils chromatographiques d'exclusion stérique (CES) de la gomme arabique d'Acacia(Sigma), détection à 215 nm (trait plein), et à 280 nm (trait pointillé). (A), Profil chromatographique obtenu à 215 nm ; (B), profil chromatographique obtenu à 215 et 280 nm. Flèche, pic différent entre 215 et 280 nm.

Les masses moléculaires de la gomme arabique d'acacia obtenues par notre méthode de chromatographie après détection à 215 nm (Fig. 38) ont été comparées aux masses moléculaires

d'AGPs de gomme arabique d'acacia séparées par exclusion stérique suivi d'une détection MALLS (Renard et al., 2006; 2012). L'analyse des chromatogrammes montre que deux groupes de pics se distinguent (Fig. 38A, B) : un entre 8 et 14 mL de volume d'élution et l'autre entre 18 et 24 mL d'élution.

Les masses moléculaires obtenues avec la calibration faite avec des polysaccharides donnent des valeurs quatre fois inférieures à celles obtenues avec la calibration faite avec des protéines. Une différence similaire avait été observée. Les valeurs proposées par la littérature sont très proches de celles obtenues avec la calibration de protéines (Tableau 4).

Tableau 4 : Masses moléculaires apparentes des différents pics séparés par chromatographie d'exclusion stérique et détection aux UV dans la gomme arabique d'Acacia (Sigma), comparées à celles de la littérature.

		1	2	3	4	5	6
HPSEC (kDa)	Sucre	367	156	40	0,8	0,3	0,1
	Protéine	1835	776	200	3,9	1,3	0,7
HPSEC/MALLS (kDa)							
Renard et al. (2006)		1860	776	286	-	-	-
HPSEC/MALLS (kDa)							
Beltra et al. (2005)		1800	365	115	-	-	-

Les protéines utilisées pour la calibrations sont globulaires alors que les polysaccharides sont linéaires. La différence de structure serait à l'origine de la différence des masses moléculaires apparentes obtenues (Tableau 5). La fraction protéique des AGPs influencerait la conformation de la molécule native et par conséquent la masse moléculaire apparente de cette dernière. Cependant, la conformation structurale des AGPs est également fonction de la taille des chaînes glucidiques qui la compose. En réduisant le nombre de chaînes glucidiques et en augmentant leur taille, on peut passer d'une conformation globulaire à une conformation linéaire. La structure des AGPs de la gomme arabique d'Acacia, plutôt globulaire, serait attribuable à la fois à la fraction protéique, mais également à la diversité des chaînes glycaniques courtes portées par la protéine native.

Les trois premières fractions (Fig. 38) obtenues sont décrites dans la littérature (Beltrán et al., 2005, Renard et al., 2006). Les fractions 4 à 6 (Fig. 38) de masse moléculaire inférieure à 7 kDa

ne correspondraient pas à des AGPs mais à des résidus issus de la préparation de l'échantillon. La détection à 280 nm d'un extrait commercial de gomme arabique a permis d'identifier trois fractions qui sont décrites dans la littérature comme étant respectivement constituées de glycoprotéines (GP) contenant 47,8% de protéines, d'arabinogalactane protéines (AGPs) possédant 11,8% protéines et d'arabinogalactane peptides (AG) avec 0,35% de protéines. (Osman et al., 1993; Renard et al., 2006). Le pic 3, de nos chromatogrammes, pouvant correspondre aux AG est faiblement détecté à 280 nm. Cette faible détection serait due à une faible quantité en protéines. La fraction présentant le pic d'intensité le plus élevé pourrait elle correspondre au pic 2 et donc à la fraction GP de la gomme arabique. Enfin, la fraction AGPs pourrait être la première fraction éluée d'autant que les masses moléculaires déterminées après chromatographie d'exclusion stérique sont en accord avec celles classiquement déterminées pour ce type de molécule, soit 1800 kDa (Renard et al., 2006, 2012).

La calibration à l'aide de protéines sera donc utilisée pour déterminer la masse moléculaire des AGPs d'embryons de cacaoyer.

III.4.3.2. Détermination des masses moléculaires des AGPs purifiées à partir du génotype SNK 630 de cacaoyer

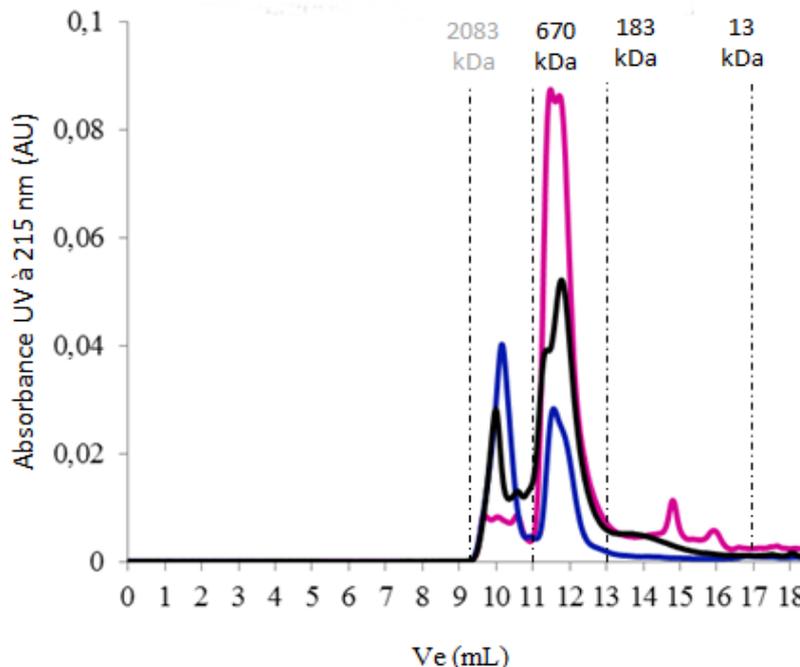


Figure 39 : Profils chromatographiques d'exclusion stérique (CES) détectés à 215 nm d'extrait de protéines préalablement purifiées par le β -D-glucosyl Yariv chez *Theobroma cacao*, génotype SNK 630 au stade de développement VII. (Rose), embryons zygotiques ; (Bleu), embryons somatiques secondaires; (Noir) milieu de culture des embryons somatiques secondaires.

Les AGPs isolées à partir des embryons zygotiques, des embryons somatiques secondaires, et du milieu de culture issu des embryons somatiques secondaires, sont comparées (fig.39). L'analyse du chromatogramme montre que trois groupes de pics sont détectés. Un groupe (Grp. I) compris entre 2083 et 670 kDa, un second (Grp. II) de 670 à 183 kDa et un troisième (Grp. III) allant de 180 à 13 kDa (Fig. 39). Les masses moléculaires de chacun des pics ont été déterminées et sont rassemblées dans le tableau 5. La chromatographie d'exclusion stérique permet de séparer un mélange complexe de macromolécules dont certaines ont des masses moléculaires importantes (Fig. 39). Cependant, on peut noter que même si la qualité des profils chromatographiques a été grandement améliorée par rapport à ceux obtenus en phase inverse (Fig. 35), certains pics ne sont que très difficilement séparés. Les masses moléculaires obtenues sont pour certaines proches des masses moléculaires des AGPs de la gomme arabique (1800 kDa) mais très éloignés de celles trouvés chez *Triticum aestivum* (125 kDa) et *Ipomea batatas* (128 kDa).

Tableau 5 : Liste des masses moléculaires des pics de protéines, de *Theobroma cacao*, clone SNK 630, au stade de développement VII, préalablement précipitées avec le β -D-glucosyl Yariv puis séparées par chromatographie d'exclusion stérique à 215 nm.

	Groupe I	Groupe II	Groupe III
Embryons zygotiques	1496		
	1340	480	61
	1027	425	27
Embryons somatiques Ilaires	1162	442	-
	691		
Milieu de culture des embryons somatiques Ilaires	1420	530	99
	879	406	

III.4.3.3. Comparaison des profils chromatographiques des AGPs de cacaoyer séparées apr CES couplée détection UV à 215 nm et 280 nm

A l'instar des travaux réalisés avec la gomme arabique d'Acacia (Fig. 39), les extraits de protéines de *T. cacao* génotype SNK 630 au stade embryonnaire VII ont été analysés à 215 nm

(Fig. 39) et 280 nm (Fig. 40). Les chromatogrammes obtenus donnent des profils superposables (Fig. 39, 40), constitués globalement de 3 groupes de pics s'étalant sur une gamme de masses moléculaires allant de 2000 à 13 kDa. Cependant, les niveaux de sensibilité de la détection à 280 nm sont 10 fois plus faibles en moyenne que ceux mesurés à 215 nm. La détection à 215 nm permet, entre autres, d'identifier les liaisons peptidiques qui sont bien plus nombreuses que les molécules aromatiques détectées à 280 nm. Cette différence est un élément permettant d'expliquer la moindre sensibilité de la détection à 280 nm/215 nm. De plus les AGPs sont des O-glycoprotéines dont la séquence peptidique est pauvre en acides aminés aromatiques. La détection à 215 nm semble donc une méthode de détection plus appropriée pour "monitorer" les AGPs après chromatographie. Cependant la détection à 280 nm nous apporte des précisions quant à la composition moléculaire des molécules purifiées avec le β -D-glucosyl Yariv.

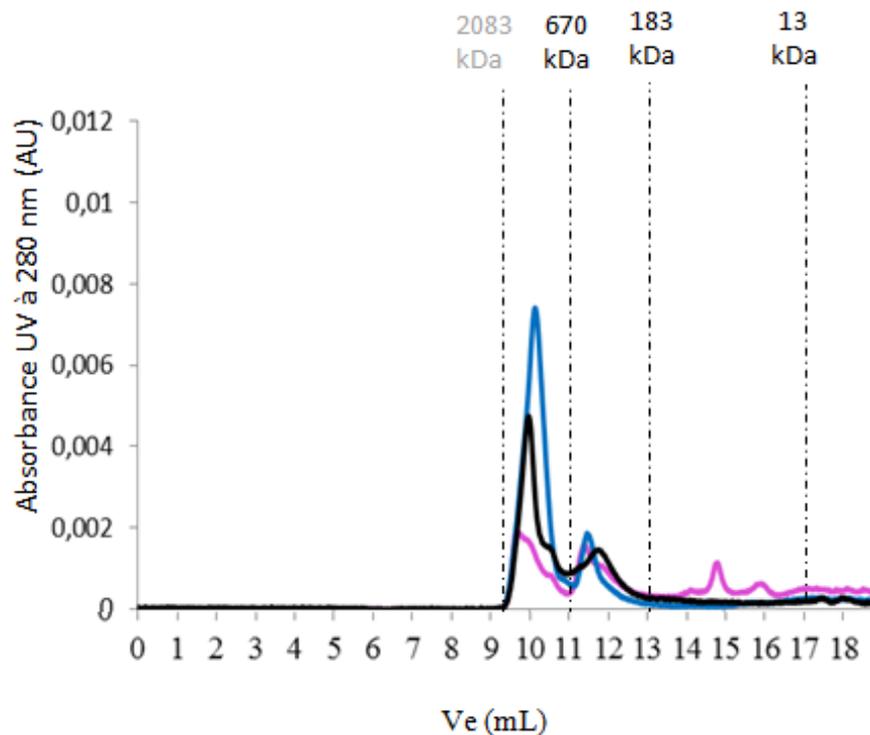


Figure 40 : Profils chromatographiques d'exclusion stérique (CES), détectés à 280 nm, d'extrait de protéines préalablement purifiées par le β -D-glucosyl Yariv chez *Theobroma cacao*, génotype SNK 630 au stade de développement VII. (Noir), embryons zygotiques; (Bleu), embryons somatiques secondaires ; (Rose), milieu de culture des embryons somatiques secondaires.

III.4.3.4. La fluorescence des AGPs

La mesure des bio-aérosol par la détection de la fluorescence du tryptophane intrinsèque a été réalisée avec une corrélation de 0,99 par Cai et al. (2011), révélant la détection par fluorescence comme une méthode très sensible. De plus, les résidus de tryptophane ont été retrouvés dans la

gomme arabique (Renard et al., 2006). Nous nous sommes proposé de rechercher l'intérêt de la détection par fluorescence pour l'étude des AGPs de cacaoyer. Des extraits de protéines susceptibles de contenir des AGPs de différentes origines : (i) embryons zygotiques et somatiques de cacaoyer, (ii) des feuilles de peuplier hybride, clone 717 1B4 et (iii) une solution commerciale de gomme arabique d'Acacia (Sigma), ont été analysées par fluorescence afin d'en déterminer, de manière générale, le couple d'Excitation/Emission qui conviendrait à l'étude de la fluorescence des AGPs.

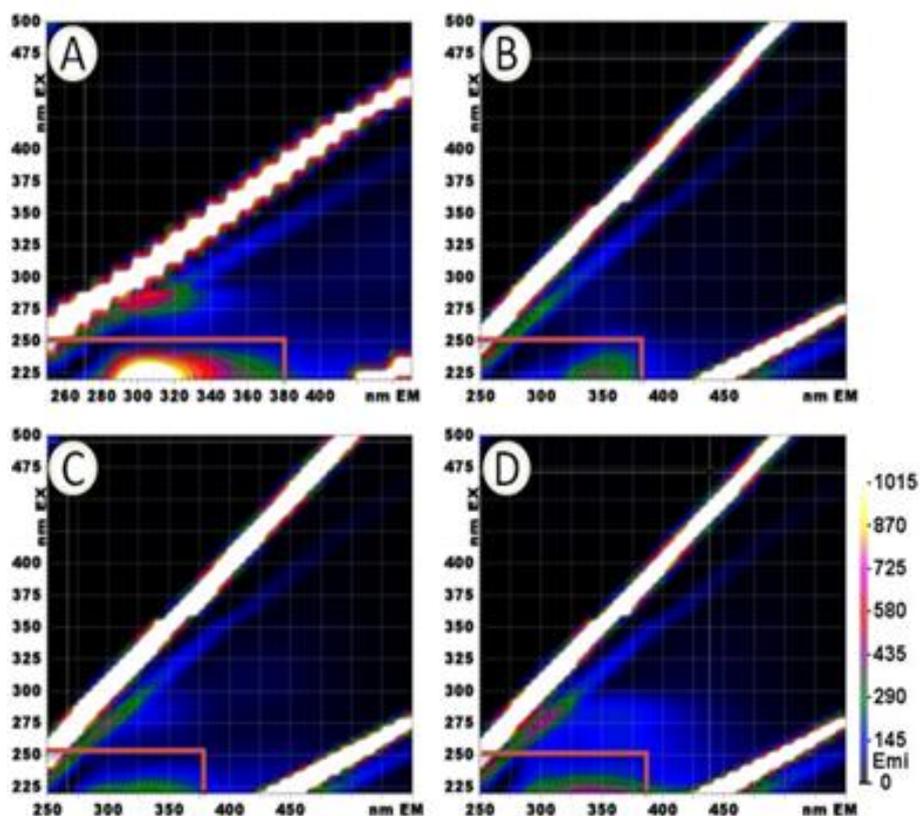


Figure 41 : Spectre de fluorescence 3D d'extrait de protéines dans un tampon phosphate 50 mM à pH $7 \pm 0,1$. (A), AGPs de gomme arabique d'Acacia ; (B), AGPs purifiées par β -D-glucosyl Yariv des embryons zygotiques de *Theobroma cacao*, génotype SNK 630 au stade de développement VII ; (C), AGPs purifiées par β -D-glucosyl Yariv des embryons somatiques secondaires de *Theobroma cacao*, génotype SNK 630 au stade de développement VII, (D), AGPs purifiées par β -D-glucosyl Yariv des feuilles de peuplier hybride clone 717 1B4.

Les spectres de fluorescence des différentes AGPs présentent des zones de fluorescence dans les régions associées aux protéines aromatiques (tyrosine et tryptophane) (Ex : 200-250 nm/Em : 280-380 nm) (Fig. 41). Cependant la fluorescence est plus intense dans la région du tryptophane pour un couple Ex/Em : (200-250/ 330-380 nm). Cette région domine généralement le spectre de fluorescence. La meilleure longueur d'onde de détection des protéines aromatiques,

correspondant au couple d'Ex/Em 221/350 nm, a été définie par Bourven et al. (2012). Ce couple d'Ex/Em est approprié pour la détection des protéines végétales et plus particulièrement des AGPs (Fig. 41).

III.4.3.5. Comparaison des empreintes des AGPs de la gomme arabique obtenues par détection UV et fluorescence couplée à la CES

Les chromatogrammes obtenus après chromatographie d'exclusion stérique, couplée à une détection par fluorescence, ont été comparés à ceux obtenus après détection UV à 215 et 280 nm (Fig. 42).

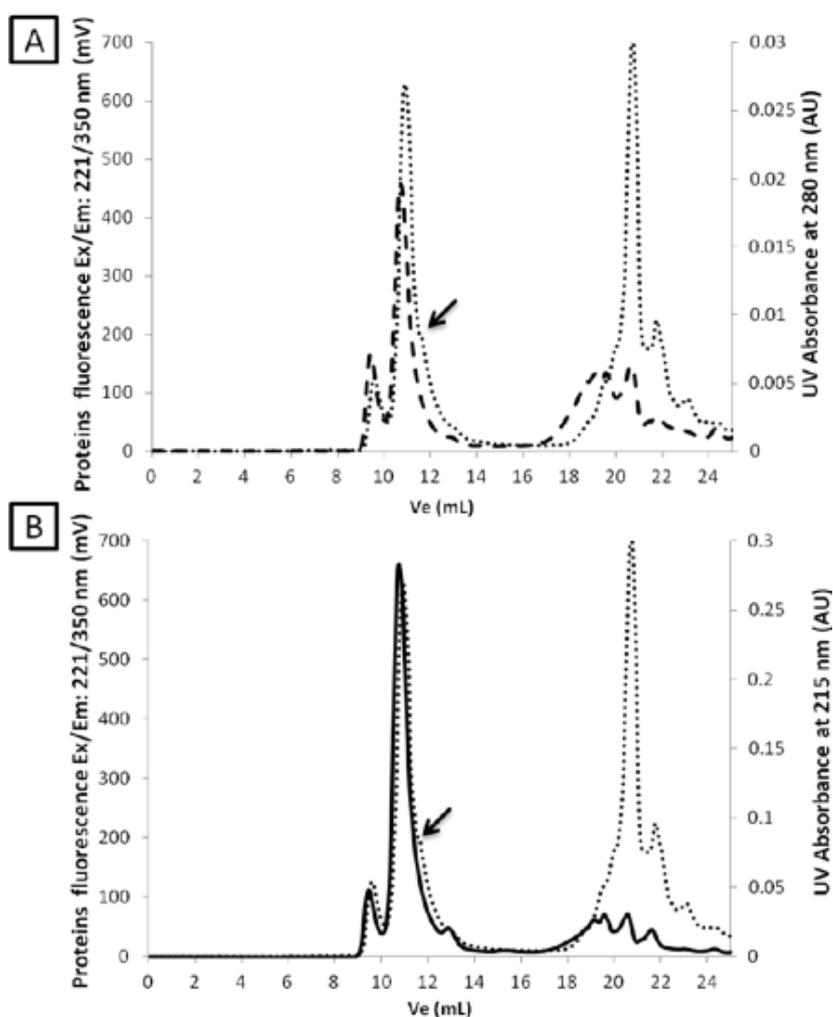
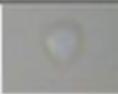
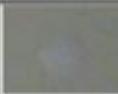
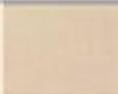
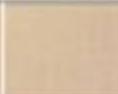
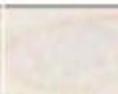


Figure 42 : Profils chromatographiques d'exclusion stérique (SEC) de la gomme arabique d'Acacia. (A), trait pointillé : spectre de fluorescence Ex/Em 221/350, trait pointillé gras : spectre UV 280 nm ; (B), trait pointillé : spectre de fluorescence Ex/Em 221/350, trait plein gras : spectre UV 215 nm. Flèche, épaulement du spectre de fluorescence Ex/Em 221/350

La fluorescence des protéines permet de détecter un épaulement pour le pic majoritaire de la gomme arabique d'Acacia (Fig. 42) suggérant l'existence d'un mélange de molécules aux propriétés proches dans l'extrait commercial d'AGP. La fluorescence permet d'approcher encore plus cette hétérogénéité par rapport aux détections dans l'UV. Ceci pourrait être dû à la grande sensibilité de la fluorescence ou encore à sa capacité à détecter le changement de conformation des protéines (Likhtenshtein, 2009).

La chromatographie d'exclusion stérique couplée à plusieurs méthodes de détection : (i) fluorescence des protéines et (ii) détections aux UV serait un outil efficace d'analyse des AGPs.

Tableau 6 : Résultats des tests biochimiques des pics collectés à la suite des chromatographies d'exclusion stérique des AGPs de la gomme arabique d'Acacia (Fig. 38, 42). Test de précipitation au β -D-glucosyl Yariv, test dot blot avec les anticorps (LM2 et JIM4), test à l'orcinol sulfurique. + présence, - absence.

	1	2	3	4	5	6
β -Glc-Yariv						
	++	+++	+++	-	-	-
AGP immuno-detection						
	+++	+++	++	-	-	-
Carbohydate						
	+	+++	+++	+	+	-

Les protéines détectées par fluorescence ou à l'aide des UV à 215 nm ont été soumises à une série de tests biochimiques afin d'en déterminer la nature moléculaire : test à l'orcinol sulfurique pour l'identification des sucres, test de précipitation des AGPs au β -D-glucosyl Yariv et dot blot contre des anticorps (LM2 et JIM4) (Tableau 6). Les résultats obtenus montrent que les trois premiers pics présentent des réactions positives aux trois tests (Tableau 6), et peuvent être assignés à des AGPs. Les trois derniers pics ne correspondraient pas à des AGPs. Ces résultats sont en accord avec la détermination de la masse moléculaire qui montre que les masses moléculaires des trois derniers pics sont trop faibles pour être des AGPs (Gane et al., 1995; Göllner et al., 2011).

Cette mise au point technique nous permet d'envisager maintenant son utilisation comme méthode efficace pour l'analyse et le suivi des AGPs individuelles au cours du développement embryonnaire.

III.4.3.6. Association de la détection UV/fluorescence des protéines couplée à la chromatographie d'exclusion stérique pour l'analyse des embryons somatiques du génotype SNK 630

La chromatographie d'exclusion stérique couplée à une double détection (fluorescence et UV à 215 nm) a été appliquée aux protéines d'embryons somatiques secondaires du génotype SNK 630 de *T. cacao*, préalablement purifiées par le β -D-glucosyl Yariv. Cette technique nous a permis d'identifier 2 pics après une détection aux UV à 215 nm et 5 pics en fluorescence (Fig. 43).

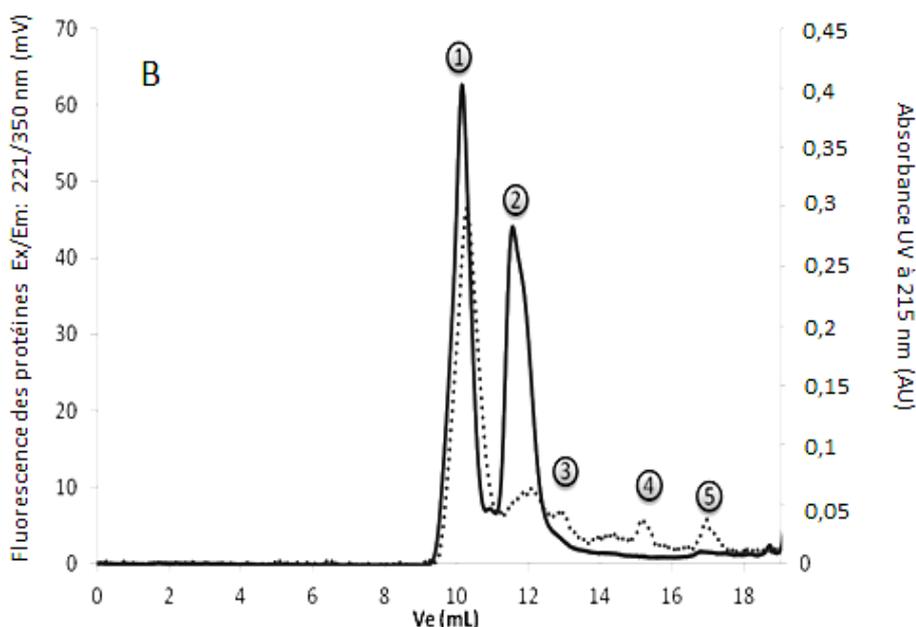


Figure 43 : Profils chromatographiques d'exclusion stérique (SEC) d'extrait de protéines d'embryons somatiques secondaires préalablement purifiées par le β -D-glucosyl Yariv chez *Theobroma cacao*, génotype SNK 630 au stade de développement VII. Trait plein, spectre UV 215 nm ; Trait pointillé, spectre de fluorescence Ex/Em 221/350 nm.

Les 2 méthodes de détection utilisées permettent d'identifier les 2 premiers pics et ceci dans des proportions similaires (Fig. 43). Par contre la fluorescence permet de détecter un plus grand nombre de pics correspondant à des molécules de faible masse moléculaire allant de 183 à 7 kDa (Tableau 7).

Tableau 7 : Comparaison des profils chromatographiques d'extraits de protéines issues d'embryons somatiques secondaires au stade VII précipitées au β -D-glucosyl Yariv (volume d'élution, masses moléculaires, nombre de pics) et détectées par fluorescence Ex/Em : 221/350 nm et aux UV à 215 nm (Fig. 46).

	1	2	3	4	5
Volume d'élution	10-10,5	11-11,5	13	15,5	17
Masse moléculaire (kDa)	1450-1140	521-483	142	75	21
Nombre de pics	2	2	1	1	1

Des tests biochimiques, similaires à ceux décrits pour la gomme arabique d'Acacia (Tableau 6) ont été réalisés sur chacun des différents pics (Tableau 8). Si les 5 pics collectés contiennent tous des sucres, seul les 3 premiers pics présentent une réponse positive à la fois avec les anticorps (LM2 et JIM4) et le β -D-glucosyl Yariv (Tableau 6). Sur la base de ces données, et en accord avec les masses moléculaires calculées, nous suggérons que les 3 premiers pics correspondent à des AGPs ou des AG peptides. Les autres pics pouvant correspondre à des produits de dégradations des AGPs et/ou des AG peptides préalablement purifiés.

Tableau 8 : Résultats des tests biochimiques des pics collectés à la suite des chromatographies d'exclusion stérique d'extraits de protéines d'embryons somatiques secondaires de *Theobroma cacao* génotype SNK 630 au stade de développement VII (Fig. 46). Protéines préalablement purifiées par le β -D-glucosyl Yariv, test de précipitation au β -D-glucosyl Yariv, test dot blot avec les anticorps (LM2 et JIM4), test à l'orcinol sulfurique. + présence, - absence.

Pics	1	2	3	4	5
Sources	AGPs des embryons somatiques SNK 630 VII				
sucre	+	+	+	+	+
Yariv-AGPs	+	+	+	-	-
Épitopes Ac LM2, Jim4	+	+	+	-	-

Après avoir mis au point une nouvelle méthode d'analyse, nous avons cherché à l'appliquer sur des extraits de protéines enrichies en AGPs après précipitation au β -D-glucosyl Yariv pour les différents génotypes à notre disposition dans cette étude (SNK 630, ICS 60, Sca 6) de *Theobroma cacao*. Dans cette dernière partie, 2 aspects ont été suivis : (i) l'évolution du pool d'AGPs et AG peptides au cours des 2 dernières phases de développement embryonnaire, et (ii) la présence d'AGPs et/ou d'AG peptides dans les milieux de culture des embryons somatiques secondaires. Ici, l'utilisation de calcs embryogènes et peu embryogènes doit nous permettre de déterminer un comportement différent quant à l'accumulation des d'AGPs et/ou d'AG peptides dans ces différents milieux. Ce dernier est important au regard de l'un des objectifs de ce travail : trouver un activateur de type d'AGPs et/ou d'AG peptides pour améliorer l'embryogenèse somatique de *Theobroma cacao*.

IV. ÉVOLUTION DU POOL D'AGPS DE 2 STADES SUCCESSIFS DES EMBRYONS ZYGOTIQUES ET SOMATIQUES DU CACAOYER ET DES MILIEUX DE CULTURE

Les AGPs sont des biomolécules dont l'implication dans la reproduction végétative et la reproduction sexuée des plantes a été démontrée. Elles sont régulées au cours de l'embryogenèse et interviennent aussi bien dans l'embryogenèse précoce que l'embryogenèse tardive (Qin et Zhao, 2006 ; Šamaj et al., 2005). Leur utilisation dans l'amélioration de l'embryogenèse somatique fait d'elles des molécules d'un grand intérêt pour l'amélioration des cultures. Cependant, toutes les AGPs ne sont pas activatrices de l'embryogenèse somatique (Poon et al., 2012). Les AGPs sécrétées par les cals embryogènes auraient un caractère différent de celles sécrétées par les cals peu-embryogènes. Nous nous proposons d'étudier l'évolution des AGPs au cours de 2 stades embryonnaires successifs : (i) stade VI et (ii) stade VII, à la fois dans les embryons zygotiques et somatiques secondaires. De façon parallèle, une comparaison des AGPs isolés de l'albumen et du milieu de culture des embryons somatiques secondaires, issus de génotypes embryogène et peu-embryogène, sera réalisée.

IV.1. Analyse des AGPs et/ou des AG peptides au stade VI et VII pour les embryons zygotiques

La technique mise au point dans la partie précédente a été appliquée aux embryons zygotiques. La figure 44 montre un profil chromatographique d'exclusion stérique d'embryons zygotiques de *T. cacao* au stade VI et VII pour le génotype ICS 60 (Fig. 44). A l'instar des résultats qui

précédent, 3 groupes de pics peuvent être mis en évidence : le groupe I se caractérise par un mélange de molécules de masses moléculaires importantes (2000 à 700 kDa), le groupe II de 700 à 180 kDa et le groupe III de 180 à 13 kDa. Dans le cas de ce génotype, il n'y a pas de différence entre les profils obtenus aux UV à 215 nm et ceux obtenus par fluorescence, excepté l'intensité des pics.

Au stade embryonnaire VI, les pics du groupe II sont les plus intenses (Fig. 44 A) alors que ce sont les pics du groupe I qui dominent au stade de développement suivant (Fig. 44 B). Une majorité de pics détectés aux UV à 215 nm et par fluorescence présentent des épaulements suggérant l'existence de mélanges moléculaires pour chacun d'entre eux (Fig. 44). La détection aux UV à 215 nm permet de distinguer 2 pics dans le groupe II d'intensité équivalente (Fig. 44A). Ces 2 pics se retrouvent dans le stade de développement suivant mais sous la forme d'un épaulement et dans des proportions relatives différentes (Fig. 44B). Ces résultats suggèrent que le pool d'AGPs et/ou d'AG peptides évolue au cours de l'embryogenèse zygotique. De plus, cette étude montre que la technique utilisée est suffisamment discriminante, sans que cela soit totalement satisfaisant, pour suivre des variations quantitatives de certaines des molécules de ce mélange complexe.

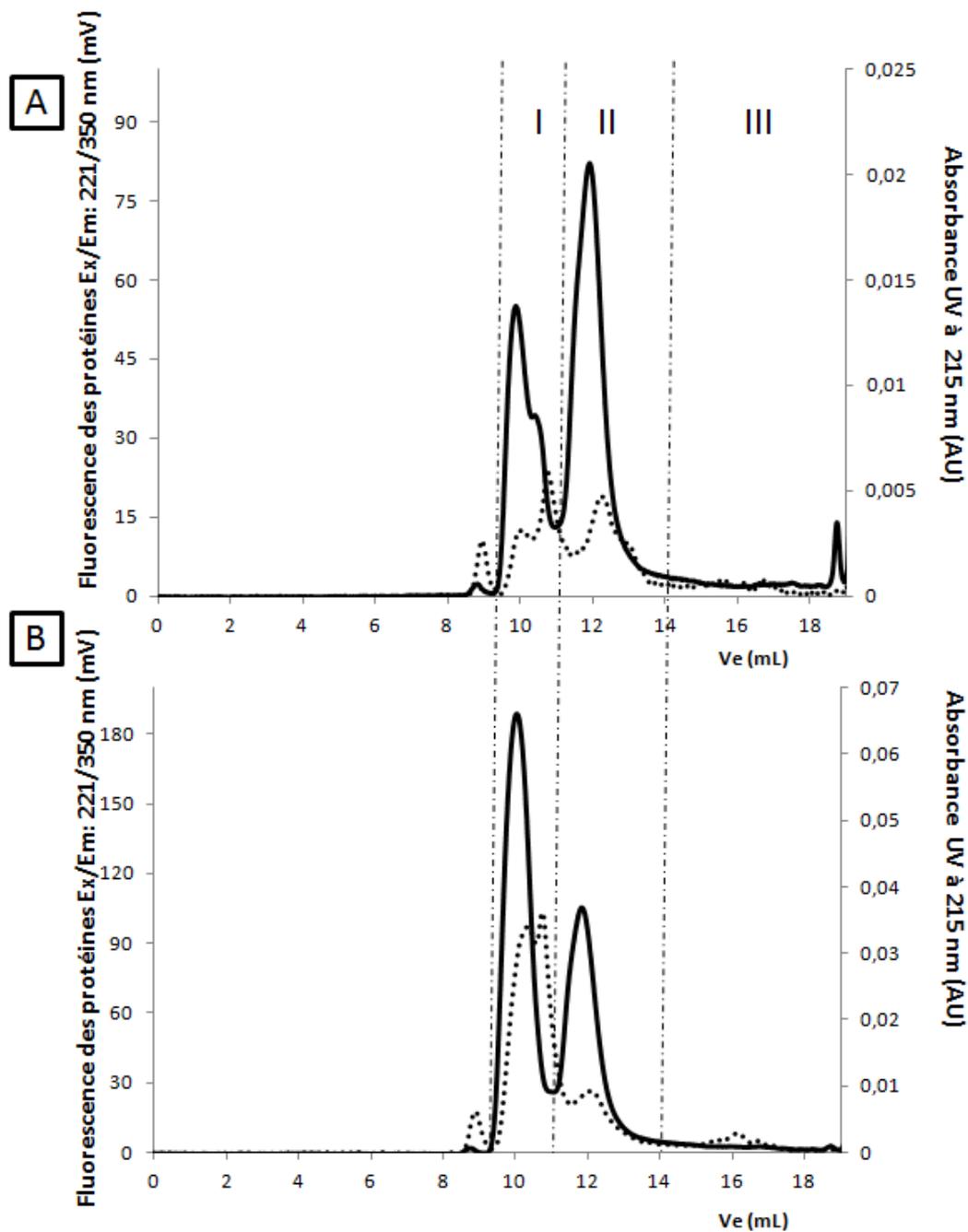


Figure 44 : Profils chromatographiques d'exclusion stérique (CES) d'extrait de protéines d'embryons zygotiques de *Theobroma cacao* génotype ICS 60. Protéines préalablement purifiées par le β -D-glucosyl Yariv (A), stade embryonnaire VI; (B), stade embryonnaire VII. (Trait plein), spectre UV 215 nm ; (Trait pointillé), spectre de fluorescence Ex/Em 221/350 nm.

Pour les masses moléculaires inférieures à 180 kDa, identifiées comme n'étant pas une partie intégrante des AGPs au regard des tests biochimiques réalisés (Tableau 8), des différences importantes existent également à la fois entre les stades de développement et entre les méthodes

de détection utilisées dans ce travail. Dans le groupe III on détecte un pic à 16 mL d'élution par fluorescence des protéines, et un tout petit pic à 17,5 mL aux UV (Fig. 44A). Pour le stade suivant, un petit pic est détecté vers 14 mL d'élution par fluorescence des protéines et un autre pic de forte intensité est détecté aux UV à 17,5 ml d'élution (Fig. 44B).

L'évolution des AGPs dans les embryons zygotiques du génotype ICS 60 est similaire à celle observée dans les embryons zygotiques du génotype SNK 630.

IV.2. Analyse des AGPs et/ou des AG peptides au stade VI et VII pour les embryons somatiques secondaires

Les chromatogrammes, obtenus à partir des extraits d'AGPs, purifiées au β -D-glucosyl Yariv, provenant d'embryons somatiques secondaires de *T. cacao* pour les génotypes SNK 630 (Fig. 45) et Sca 6 (Fig. 46) aux stades embryonnaires VI et VII confirment la présence de mélanges moléculaires dans tous ces extraits protéiques. De même, à l'instar de ce qui a été décrit pour les embryons zygotiques, 3 groupes de pics peuvent être identifiés sur la base des masses moléculaires. Pour les embryons somatiques, ce sont les 2 premiers groupes de pics qui dominant le chromatogramme (Fig. 45, 46). De même, et ceci quelque soit le génotype, on observe une inversion des dominances des pics entre le groupe I et II lors du passage du stade de développement VI au stade VII (Fig. 45, 46). Au stade VI, ce sont les pics chromatographiques du groupe I qui dominant alors que c'est l'inverse pour le stade suivant. Ceci suggère que le génotype n'impacte pas la distribution des AGPs purifiées au β -D-glucosyl Yariv, mais que c'est bien le stade de développement qui est important quant à leur distribution dans les embryons somatiques. Des résultats similaires peuvent être décrits entre type d'embryons différents. Ainsi, l'embryogenèse zygotique du génotype ICS 60 (Fig. 44) présente des profils identiques à ce qui a été décrit pour les embryons somatiques des génotypes SNK 630 (Fig. 45) et Sca 6 (Fig. 46).

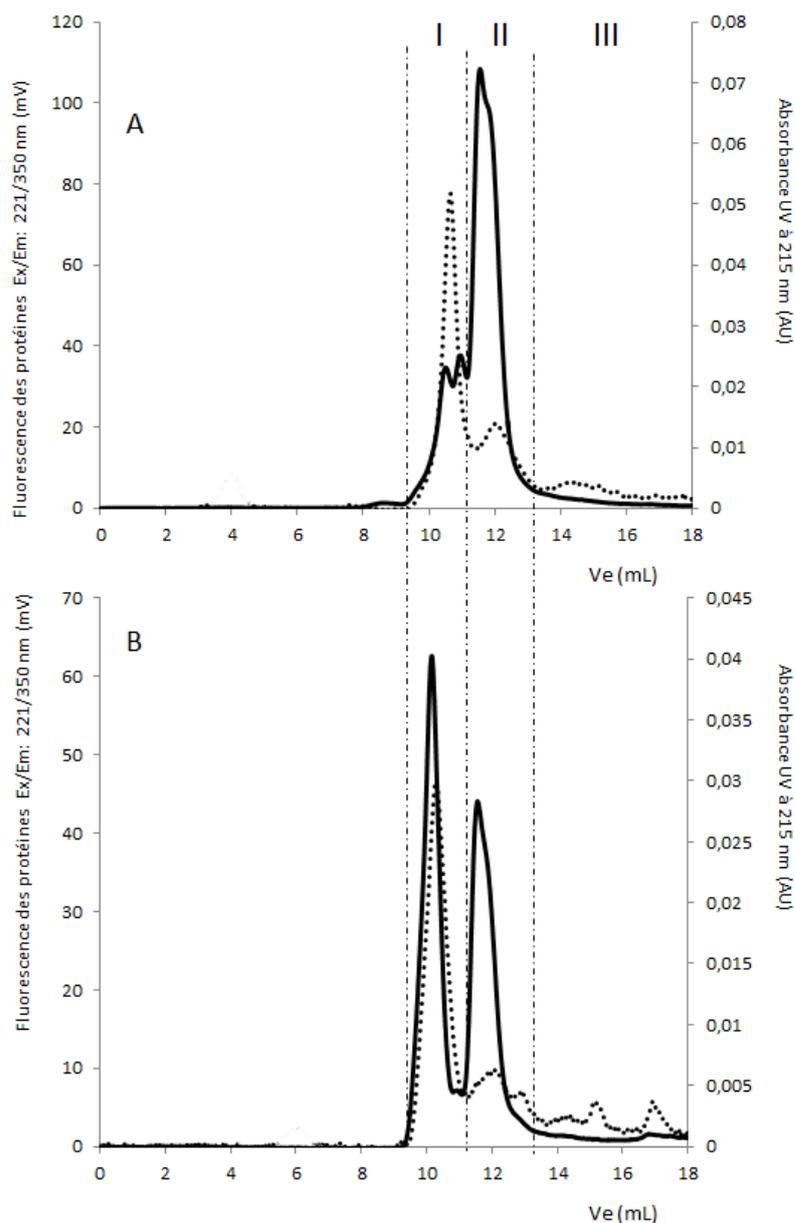


Figure 45 : Profils chromatographiques d'exclusion stérique (CES) d'extrait de protéines d'embryons somatiques secondaires préalablement purifiées par le β -D-glucosyl Yariv de *Theobroma cacao* génotype SNK 630. (A), stade embryonnaire VI ; (B), stade embryonnaire VII. Trait plein, spectre UV 215 nm ; Trait pointillé, spectre de fluorescence Ex/Em 221/350 nm.

Au stade embryonnaire VI, 2 pics sont détectés aux UV à 215 nm et 1 en fluorescence (Fig. 45A). Ce résultat suggère que le pic détecté par fluorescence pourrait correspondre à un mélange de 2 molécules détectées aux UV. Ces 2 molécules putatives, différant par leur taille respective, mais pas par leur composition en résidus aromatiques qui apparaîtraient sous la forme d'un seul pic en fluorescence (Fig. 45A).

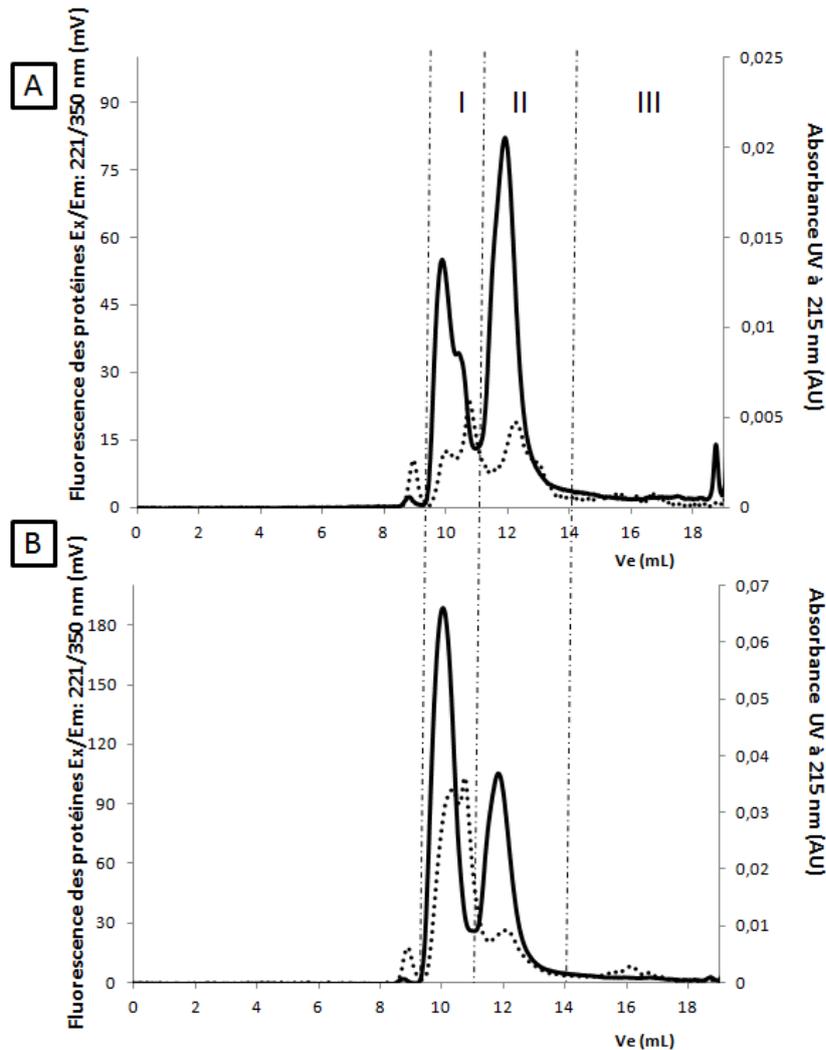


Figure 46 : Profils chromatographiques d'exclusion stérique (CES) d'extrait de protéines d'embryons somatiques secondaires de *Theobroma cacao* génotype Sca 6. Protéines préalablement purifiées par le β -D-glucosyl Yariv (A), stade embryonnaire VI ; (B), stade embryonnaire VII. Trait plein, spectre UV 215 nm ; Trait pointillé, spectre de fluorescence Ex/Em 221/350 nm.

Si les profils chromatographiques sont globalement similaires entre les 2 génotypes, on démontre des différences importantes quant à la distribution putative des AGPs et/ou des AG peptides. Ici encore, les pics chromatographiques du groupe I sont très différents entre ceux détecté aux UV à 215 nm et ceux identifiés en fluorescence suggérant des différences quant à la structure primaire des protéines. De plus, pour ce génotype, un pic supplémentaire apparaît pour un volume d'éluion d'environ 9 mL.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que si l'évolution des profils d'AGPs et/ou d' AG peptides semble dépendante des stades de développement embryogène et non du type d'embryons et/ou du génotype, la composition de la séquence peptidique des molécules présentes à chacun de ces

stades de développement est différente pour chacun des génotypes et probablement pour chacun des types d'embryons.

IV.3. Analyse des AGPs et/ou des AG peptides au stade VI et VII dans les milieux de culture des embryons somatiques secondaires

Les embryons zygotiques et somatiques ont besoin pour se développer d'un milieu nutritif qui peut être naturel, l'albumen, ou artificiel, le milieu de culture. Pour mieux comprendre l'implication des AGPs dans le développement des embryons de cacaoyer, nous avons comparé les profils chromatographiques des protéines purifiées en présence de β -D-glucosyl Yariv de l'albumen et des milieux de culture embryogène et peu embryogène.

À l'instar de ce qui a été décrit pour les embryons, 3 groupes de pics peuvent être mis en évidence dans l'albumen et les milieux de culture embryogène et peu embryogène (Fig. 47). Cependant, à la grande différence de ce qui a été démontré pour les embryons, et ceci quelque soit le génotype et le type d'embryon (zygotique ou somatique), les 3 groupes de pics ne présentent pas la même distribution de masses moléculaires. Les AGPs présentes dans le milieu de culture des cals peu embryogènes montrent un pic correspondant à un volume d'élution d'environ 9 mL (Fig. 47C), correspondant à des molécules de masse moléculaire supérieure à 2000 kDa. Les pics du groupe I sont présents dans l'albumen (Fig. 47A) et le milieu de culture des cals embryogènes (Fig. 47B), mais très peu dans le milieu de culture des cals non embryogènes (Fig. 47C). Dans l'albumen, 2 pics sont détectés, conjointement aux UV à 215 nm et en fluorescence (Fig. 47A). Pour les pics du groupe II, des différences importantes existent entre les profils chromatographiques détectés aux UV à 215 nm et ceux obtenus après une détection par fluorescence.

À la différence des AGPs et/ou les AG peptides de ce même groupe (groupe II) présents dans les embryons (Fig. 44, 45, 46), les molécules accumulées dans le milieu de culture sont constituées de protéines dont les taux en tryptophane sont faibles, d'où les faibles niveaux de détection observés en fluorescence (Fig. 47). L'application de cette méthode de suivi efficace nous a permis de mettre en évidence l'implication des AGPs dans le développement des embryons chez le cacaoyer. La comparaison des fractions des embryons zygotiques somatiques et des milieux de développement des embryons nous a conduit à identifier la fraction I comme celle qui serait plus impliquée dans l'embryogenèse du cacaoyer.

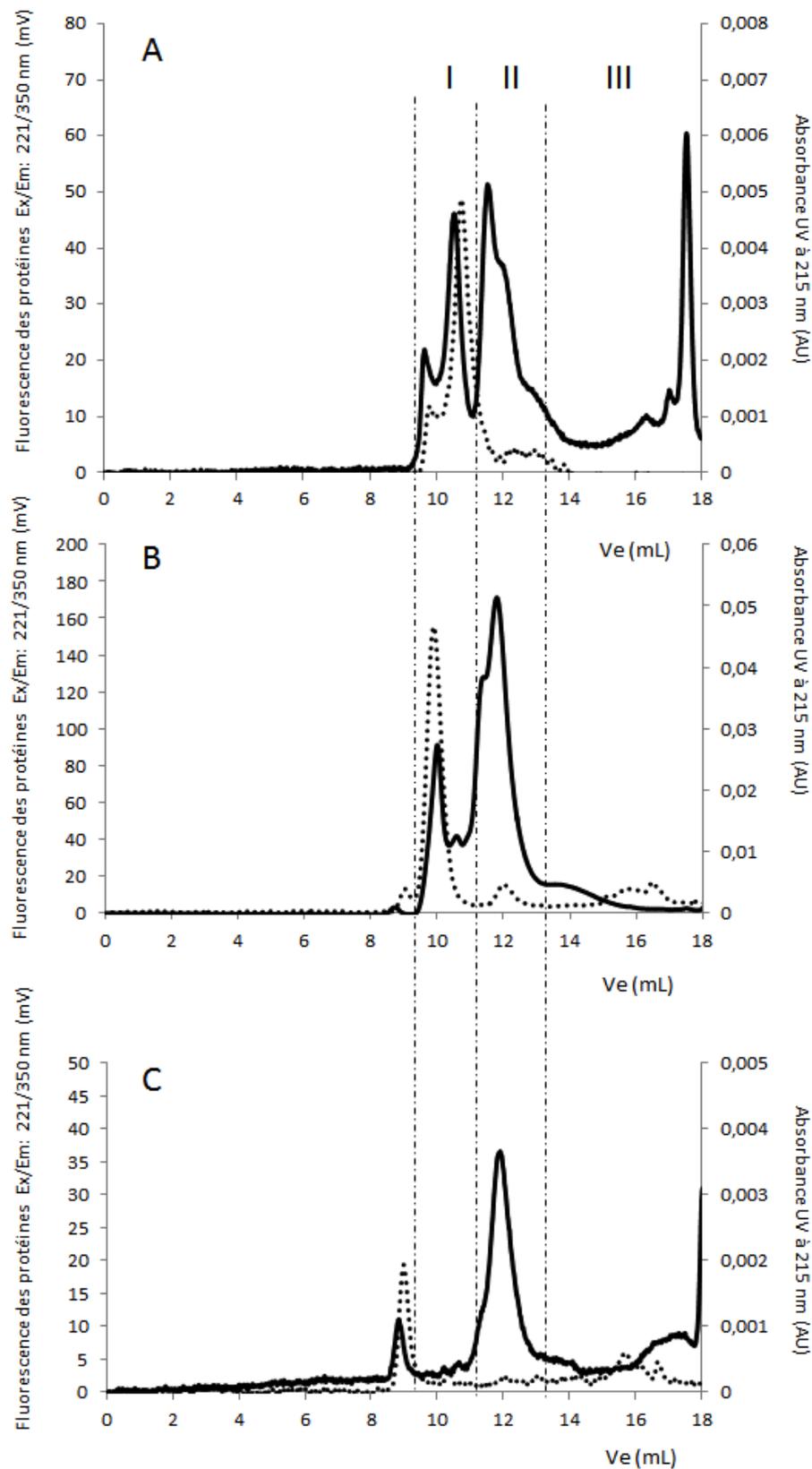


Figure 47 : Profils chromatographiques d'exclusion stérique (CES) de sécrétions d'AGPs de *Theobroma cacao*, purifiées par le β -D-glucosyl Yariv. (A), albumen du génotype embryogène SNK 630; (B), milieu de culture génotype embryogènes, SNK 630 ; (C), milieu de culture génotype peu embryogènes (ICS 60). (Trait plein), spectre UV 215 nm ; (Trait pointillé), spectre de fluorescence Ex/Em 221/350 nm.

PARTIE D. DISCUSSION

I. EXPRESSION D'AGPs CHEZ LE CACAOYER

La technique d'embryogenèse somatique n'est pas complètement maîtrisée chez le cacaoyer et la réponse des explants demeure dépendante des génotypes. Afin de mettre au point des protocoles fiables applicables à tous les génotypes, nous avons analysé trois génotypes, du plus embryogène au moins embryogène, Sca 6, SNK 630 et ICS 60. Nous nous sommes intéressés à un groupe de protéoglycanes présent chez tous les végétaux, jamais étudié chez le cacaoyer, les arabinogalactanes protéines. Ces molécules sont utilisées comme activatrices de l'embryogenèse somatique chez le chou et le coton (Yuan et al., 2012 ; Poon et al., 2012). Elles sont impliquées aussi bien dans l'embryogenèse zygotique que dans l'embryogenèse somatique (Zhong et al., 2011 ; Yu et Zhao, 2012 ; Portillo et al., 2012). L'étude de ces protéoglycanes au cours de l'embryogenèse d'une espèce ligneuse tropicale. a été réalisée chez *Araucaria angustifolia* (Dos Santos et al., 2006). Des AGPs ont aussi été étudiées chez d'autres plantes tropicales telles que *Musa spp.* (Pan et al., 2011) et *Agave tequilana* (Portillo et al., 2012). Cependant, ces travaux ne portent pas sur l'expression comparative de ces protéoglycanes au cours de l'embryogenèse zygotique et somatique de ces plantes.

Nous avons identifié, en avant première, des AGPs, simultanément dans les embryons zygotiques et somatiques.

Une analyse 1D du protéome des embryons aux stades cotylédonaire a montré que les protéines sont plus exprimées dans les embryons zygotiques que dans les embryons somatiques. Cette différence a également été observée chez le génotype PA 150 du cacaoyer par Noah et al. (2013). Les bandes peptidiques de masse moléculaire supérieure à 120 kDa semblent présenter une expression différentielle au cours du développement des deux types d'embryons. En effet, ces bandes sont plus faiblement détectées dans les embryons zygotiques que dans les embryons somatiques. Cette faible détection pourrait être liée à la présence des résidus non peptiques car les bandes polypeptidiques des AGPs peuvent être masquées par les chaînes polysaccharidiques (Mashiguchi et al., 2004). De plus, l'analyse du glycoprotéome a montré que le pool de glycoprotéines de faible poids moléculaire était nettement moins glycosylé que le pool de haut

poids moléculaire. Or, ce pool de glycoprotéines, correspond aux bandes faiblement détectées dans le protéome des embryons zygotiques. La glycosylation du résidu protéique justifierait donc la faible détection de ces bandes de peptides. Les protéines des embryons zygotiques seraient de ce fait plus fortement glycosylées que celles des embryons somatiques. La faible détection des protéines et la forte glycosylation du pool de protéines de haut poids moléculaire suggère qu'il correspondrait à des O-glycoprotéines de type protéoglycanes.

Des bandes glycoprotéiques, correspondant à des AGPs, ont été détectées l'aide du β -D-glucosyl Yariv (Seifert et Roberts, 2007 ; Popper 2011) dans les suspensions cellulaires d'*A. thaliana* (Darjania et al., 2002), dans les grains de *Oryza sativa* (Mashiguchi et al., 2004) et dans les suspensions cellulaires embryons de *Araucaria angustifolia* (Maurer et al., 2010 ; Dos Santos et al., 2006). Dans les embryons zygotique et somatique de cacaoyer ce réactif a permis de détecter une seule bande dans tous les stades cotylédonaire. De même, une seule bande, sous forme de smir, a été observée dans chaque stade de développement des embryons zygotiques de *A. angustifolia*, bien que l'analyse ait été faite dans les mégagamétophytes (Dos Santos et al., 2006). Il faut souligner que malgré sa capacité à précipiter plusieurs AGPs, le réactif de Yariv ne permet pas de les détecter séparément. Pourtant, cette famille hyperglycosylée de glycoprotéines riches en hydroxyproline est très diversifiée, et une détection plus spécifique a été possible en utilisant des anticorps anti AGPs (Chapman et al., 2000 ; Saare-Surminski et al., 2000). Deux bandes, correspondant à deux AGPs de masses moléculaires voisines, ont alors été mises en évidence, à la fois dans les embryons zygotiques et dans les somatiques primaires et secondaires.

Nous avons également identifié des AGPs dans l'albumen des embryons zygotiques et dans le milieu de culture des embryons somatiques de cacaoyer. Or, des AGPs ont déjà été mises en évidence dans le milieu de culture de la chicorée, *Cichorium* (Chapman et al., 2000) et du palmier pêche, *Bactris gasipaes* K. (Steinmacher et al., 2012). Les AGPs présentes dans le milieu de culture ne proviennent pas seulement des embryons mais aussi des cals (Steinmacher et al., 2012). Van Hengel et al. (2002) montrent qu'une série d'AGPs absente avant la fécondation apparaît avec la cellularisation de l'albumen et une corrélation entre cette cellularisation de l'albumen et la quantité d'AGPs a été établie. De plus, chez *Coffea arabica*, des AGPs ont été mises en évidence dans l'albumen (Sutherland et al., 2004).

L'hypothèse de la présence d'AGPs sulfatées aussi bien dans l'albumen que dans les embryons a été émise.

Dans *Pistacia lentiscus* des protéoglycanes contenant 18,4% d'acides uroniques ont été identifiés par le bleu Alcian à pH 2,5 (Kottakis et al., 2008). Mais, à pH 1, ce colorant se lie sélectivement aux protéoglycanes sulfatés (Spicer et al., 1992 ; Gargiulo et al., 2000), mis en évidence dans tous les types embryons de cacaoyer étudiés et dans l'albumen. Les AGPs sulfatés sous formes d'Arabinogalactanes sulfatées sont décrites chez les algues. Chez *Codium fragile*, elles ont été caractérisée par une coloration au bleu de toluidine à pH 1, puis par spectrométrie infra rouge (Estevez et al., 2009). Cette hypothèse de sulfatation amène une réflexion nouvelle quant au mécanisme d'action des AGPs au cours de l'embryogenèse.

Nous avons identifié une fraction d'AGPs potentiellement impliquée dans l'embryogenèse somatique.

Nous avons séparé par chromatographie liquide à haute performance les AGPs isolées des embryons zygotiques, de l'albumen, des embryons somatiques et du milieu de culture. La fraction éluée entre 9 et 11 ml est présente dans l'albumen, les embryons zygotiques et somatiques et le milieu de culture embryogène, mais est quasiment absente dans le milieu de culture très peu embryogène.

Il faut souligner que toutes les AGPs n'ont pas le même effet sur l'embryogenèse somatique. Celles sécrétées par les cals embryogènes sont activatrices alors que celles issus des cals non embryogènes sont inhibitrices (Egertsdotter et Von Arnold, 1995 ; Poon et al., 2012). Par ailleurs, une corrélation a été établie entre la quantité d'AGPs sécrétée dans le milieu de culture et le développement des embryons somatiques de *Euphorbia pulcherrima* (Saare-Surminski et al., 2000) et de *Bactris gasipaes* K. (Steinmacher et al., 2012). De ce fait, cette fraction d'AGPs très peu sécrétée dans les cultures peu embryogènes, serait le candidat idéal à l'induction embryogène chez le cacaoyer. Cependant, une étude appliquée est nécessaire pour déterminer son effet sur l'embryogenèse ou sur le développement des embryons.

II. IMPORTANCE DE LA CARACTERISATION DES AGPS D'EMBRYONS DE CACAOYER

La morphologie des embryons est partiellement régulée par des protéines extracellulaires, parmi lesquelles les AGPs (Egertsdotter, 1996). Afin de caractériser les AGPs dans les embryons, nous avons défini des critères morphologiques associés à la pigmentation des cotylédons, pour normaliser la comparaison entre les embryons zygotiques et somatiques. Nous nous sommes intéressés principalement au stade cotylédonnaire très diversifié.

Nous avons défini quatre stades de développement cotylédonnaire aussi bien dans les embryons zygotiques que somatiques.

Rappelons que la phase de croissance, qui correspond aux stades IV et V des embryons cotylédonnaires, est marquée par une augmentation de la taille de l'axe et des cotylédons à la fois chez les embryons zygotiques et somatiques. La phase de maturation est caractérisée par une pigmentation et une accumulation de métabolites progressives du stade VI au stade VII.

Les AGPs sont exprimées dans tous les stades cotylédonnaires. Leur analyse quantitative montre que les premiers stades de chaque phase présentent une teneur élevée par rapport aux stades suivants. Ces différences, observées dans les embryons zygotiques, somatiques et dans l'albumen, permettent d'établir la différence entre les stades de développement préalablement définis. Concernant les AGPs en phase de maturation, une différence entre les profils électrophorétiques aux stades VI et VII a été établie aussi bien dans les embryons zygotiques que dans les somatiques. Les critères définis permettent d'identifier un stade de développement dans les deux types d'embryons. La caractérisation de ces stades permet d'identifier dans les embryons somatiques, les homologues des zygotiques pour une analyse biochimique plus normalisée.

Pour déterminer les particularités biochimiques des AGPs des embryons de cacaoier, nous avons étudié l'hydrophobicité et les masses moléculaires apparentes des différentes fractions des AGPs purifiées.

La séparation des AGPs des embryons et celles du milieu de culture par chromatographie montre plusieurs AGPs d'hydrophobicité différente. Un pool d'hydrophobicité des AGPs a également été observée chez la gomme arabique d'Acacia, chez l'arabette et le cotonnier (Renard et al., 2006 ; Dajarnia et al., 2002 ; Poon et al., 2012). Chez le cacaoier, une fraction majoritaire renferme la presque totalité des AGPs. Eluée entre 10 et 16% d'acétonitrile, cette fraction peu homogène est la plus hydrophile. La présence de cette fraction dans les AGPs est une caractéristique. Une différence a été observée entre les calcs embryogènes et non embryogènes du cotonnier (Poon et al., 2012). Mais, les profils de polarité des AGPs issues des embryons zygotiques, somatiques, ou du milieu de culture embryogène n'ont pas permis de les distinguer. Nous avons de ce fait réalisé une analyse de la fraction majoritaire des AGPs, éluee en premier, qui serait très glycolysées selon Dajarnia et al. (2002) dans *A thaliana*. De même les AGPs de la fraction hydrophile du cotonnier sont très glycosylées (Poon et al., 2012). L'analyse de composition en monosaccharides de cette fraction montre que le pourcentage molaire en galactose est plus élevée dans les embryons somatiques et zygotiques par rapport au milieu de culture. Les AGPs du cacaoier sont aussi caractérisées par la présence du fucose, également détecté dans celles du peuplier (Wu et al., 2010).

Les fractions de la gomme arabique obtenues en fonction de leur hydrophobicité contiennent des molécules de masses différentes (Renard et al., 2006). Les masses moléculaires de ces fractions, obtenues au cours de nos travaux grâce à une calibration par des protéines, sont comparables à celle de la littérature, contrairement à l'étalonnage avec les polysaccharides qui donnent des masses 3x plus faibles. Cette différence entre les deux calibrations, déjà été observée par Avella et al. (2010), serait liée à la structure des protéines (globulaire) et des polysaccharides (linéaire). La protéine aurait de ce fait un rôle déterminant dans la structure des AGPs. De plus, la détection des AGPs par fluorescence montre que leur couple d'Excitation/Emission 200-250 nm/280-380 nm correspond à celui des protéines aromatiques (Chen et al. 2003).

Dans le cacaoier, l'analyse de la masse moléculaire apparente des AGPs natives montre que les masses moléculaires se répartissent sur un éventail allant de 7 à plus de 1250 kDa et trois groupes de pics ont été identifiés 7-180 kDa ; 180-670 kDa ; > 670 kDa.

La détermination de la masse moléculaire permet également de caractériser les AGPs dénaturées de cacaoyer, Leur masse moléculaire se situe autour de 130 kDa, inférieure à celle de la gomme arabique commercialisée (Sigma), et de celle du peuplier, déterminée par Lafarguette et al. (2004). Cette caractérisation des AGPs de cacaoyer devra être poursuivie par la détermination de la séquence peptidique et une recherche bioinformatique de la séquence génique codant cette protéine.

III. DIVERSITE DES AGPs DES EMBRYONS DE CACAOYER

La complexité de la structure des glycanes et le polymorphisme de la fraction protéique sont responsables de la grande diversité moléculaire des AGPs, glycoprotéines hyperglycosylées (Knox, 1997; Tan et al., 2004; Estevez et al., 2006).

L'hétérogénéité des AGPs purifiées rend leur analyse singulière difficile. Malgré la microhétérogénéité de la fraction glucidique, l'analyse de la fraction protéique nécessite très souvent une déglycosylation (Schultz et al., 2000). Or, cette réaction dénature la molécule. Finalement, pour détecter les protéines, qui sont les constituants mineurs des AGPs (1 à 10%), la fluorescence, qui est une méthode très sensible de détection des protéines, a donné de bons résultats.

Pour étudier la diversité des AGPs de taille et de polarités différentes nous avons cherché à suivre l'évolution des différents constituants protéiques de la molécule. Cependant, la détection des protéines aux UV à 280 nm n'est ni sensible ni spécifique. En effet, Simon et al. (2009) ont montré qu'à 280 nm on détectait également les acides nucléiques. L'analyse par spectrofluorométrie a montré que les protéines des AGPs fluorescaient dans les mêmes zones que les protéines. Cette détection par fluorescence des protéines permet de détecter de manière plus sensible l'hétérogénéité des AGPs.

Nous avons ainsi développé une technique d'analyse basée sur la teneur des AGPs en composés aromatiques dans les protéines détectées par fluorescence, avec un couple Ex/Em : 221/350. Ainsi, dans une fraction homogène sur la composition en sucres on peut, grâce à la fluorescence, déterminer une hétérogénéité, si elle existe, au niveau de la fraction protéique. Par ailleurs, la fraction protéique peut être homogène tandis que la fraction glucidique est hétérogène.

La méthode, développée pour l'analyse et le suivi des AGPs, associe la détection par UV à 215 nm et par fluorescence. Elle démystifie un peu la complexité de ces macromolécules en permettant de suivre en direct une hétérogénéité des fractions et la différence de composition. Aucune méthode similaire n'est proposée par la littérature à ce jour.

IV. FONCTION BIOLOGIQUE DES AGPs AU COURS DU DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE

Les AGPs sont des protéoglycanes impliquées dans plusieurs aspects de la croissance et du développement des plantes. Elles sont notamment impliquées dans l'embryogenèse et le développement des embryons (Chapman et al., 2000). La sécrétion de ces molécules dans le milieu de culture a été observé chez le cotonnier (Poon et al., 2012) et le palmier pêche (Steimacher et al., 2012). Dans le cacaoier, comme dans le cotonnier (Poon et al., 2012), la différence établie entre les sécrétions des cals embryogènes et non embryogènes montrent que des AGPs particulières sont produites au cours de l'initiation du développement des embryons. Chez le cacaoier, cette différence met en exergue l'implication des AGPs dans l'embryogenèse somatique. Cependant, si les AGPs sécrétées dans le milieu de culture sont généralement activatrices de l'embryogenèse (Ergasdotter, 1996), certaines d'entre elles en sont inhibitrices (Poon et al., 2012). Il faut aussi souligner que la réponse des cellules à l'action des AGPs n'est pas très spécifique. En effet, les AGPs produites par une espèce végétale peuvent stimuler l'embryogenèse d'autres espèces (Van Hengel et al., 2002 ; Ergasdotter et al., 1995).

Les arabinogalactanes protéines sont impliquées dans l'acquisition de la compétence cellulaire et l'initiation de l'embryogenèse somatique. Cette acquisition de la compétence à l'embryogenèse s'accompagne de modifications pariétales. Plus particulièrement, les AGPs interagissent avec les pectines pour modifier l'élasticité de la paroi (Willats et al., 1999 ; Boughanmi et al., 2010), et établissent par leurs acides uroniques respectifs des ponts calciques. La capacité des AGPs à se fixer aux ions calcium en fonction du pH participerait aux modifications cellulaires. Les AGPs interagissent aussi avec diverses molécules dont les

phytohormones (Park et al., 2003), notamment le 2,4-D qui inhibe leur sécrétion dans le milieu de culture chez *Curcubita pepo* (Ben Amar et al., 2010).

Dans *Picea abies* (Norway spruce), les AGPs extraites de graines (embryons zygotiques) stimulent l'embryogenèse somatique (Ergersdotter et Von Arnold, 1995). Mais, les AGPs prélevées dans les graines immatures, contenant embryon zygotique et albumen, ne sont pas toutes promotrices de l'embryogenèse somatique, en effet ce sont les AGPs produites après la cellularisation complète de l'albumen qui stimulent ce type d'embryogenèse chez la carotte (Van Hengel et al., 2002). Dans le cacaoyer, les AGPs présentes dans l'albumen des embryons zygotiques sont potentiellement capables d'activer l'embryogenèse somatique dans cette même espèce.

L'étude de la fonction biologique de ces molécules au cours du développement embryonnaire a très souvent été basée sur les effets d'une carence induite par le réactif de Yariv, c'est le cas chez le tabac et la carotte, ou par l'étude des mutants (Yu et Zhao, 2012 ; Zhong et al., 2011 ; Tan et al., 2006 ; Hu et al., 2006). Nous avons envisagé pour le cacaoyer une approche déductive qui a permis de déterminer, par une analyse quantitative, des variations de teneur en AGPs pouvant être associées à leur expression en fonction de l'activité métabolique des embryons à des stades définis de développement. Ce résultat a été acquis dans les embryons zygotiques comme dans les somatiques, donc ces variations de teneur en AGPs dans les stades successifs de développement montrent que leur expression est régulée dans les deux types d'embryogenèses. De même, chez *Picea abies* la morphologie des embryons est régulée par des AGPs (Egertsdotter, 1996) et dans le palmier pêche une expression différentielle des AGPs a également été observée (Steimacher et al., 2012).

La différence entre l'embryogenèse zygotique et somatique chez le cacaoyer réside dans l'aspect morphologique marquée par des cotylédons plus développés dans les embryons zygotiques que dans les embryons somatiques, mais aussi par un développement plus important de l'axe dans les embryons somatiques que dans les zygotiques. Sur le plan physiologique, si la synthèse des AGPs est régulée au cours du développement dans les deux types d'embryogenèse, les phases où elles sont le plus sollicitées ne sont pas les mêmes. Les teneurs en AGPs sont les plus élevées dans les embryons zygotiques pendant la phase de maturation tandis que c'est pendant la phase de croissance que les embryons somatiques ont une demande accrue en AGPs. Il est nécessaire de bien identifier les exigences des embryons ou des cellules pour promouvoir leur différenciation ou leur développement.

Dans le cacaoyer, la première phase de développement des embryons cotylédonaire (stades IV et V) est caractérisée par un phénomène de croissance dans lequel des AGPs sont impliquées dans la division cellulaire, probablement comme dans le tabac (Yu et Zhao, 2012). De même, au cours des stades VI et VII, qui correspondent à la phase de maturation, l'implication des AGPs a été mise en évidence, comme c'est le cas chez *Picea alba* (Ergersdotter et Von Arnold, 1995). Au final, dans le cacaoyer les AGPs sont nettement plus exprimées au cours des étapes qui correspondent à l'accumulation des réserves dans les cotylédons, ou encore à d'autres associées à la croissance, dont l'initiation implique de profondes modifications cellulaires. Chez *A. thaliana*, Zhong et al. (2011) ont aussi montré que les AGPs sont impliquées non seulement dans la formation des cotylédons, mais aussi dans la germination des embryons.

Pour assurer leurs différentes fonctions, les AGPs pourraient emprunter plusieurs mécanismes d'action suivant les hypothèses proposées par Showalter et al. (2001). L'hypothèse de la présence d'AGPs sulfatées suggérerait une voie de prédilection au cours de l'embryogenèse. Le mécanisme d'action de ces AGPs sulfatées pourrait être comparé à celui de l'héparine, qui est une protéoglycane du règne animal. Dans ce cas on peut penser qu'elles collecteraient des ligands pour les présenter aux récepteurs appropriés (Schlessinger et al., 1995). La similitude de fonction AGPs/ héparine laisse aussi supposer une similitude de structure, qui jusque là n'a pas été mise en évidence.

Concernant le volet appliqué de notre travail, dont l'objectif est d'améliorer l'obtention d'embryons somatiques, la fraction d'AGPs embryogénique que nous avons identifiée pourrait activer des génotypes de cacaoyer non ou peu embryogènes et accroître le potentiel embryogène des génotypes embryogènes. A titre d'exemple l'apport exogène des AGPs de la gomme arabique dans le milieu de culture a permis d'améliorer l'embryogenèse chez le chou, avec un facteur 35 de multiplication d'embryons (Yuan et al., 2012). Dans le cacaoyer la valeur de ce potentiel reste à déterminer.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

I. CONCLUSION

Ce travail de thèse porte sur l'étude des arabinogalactanes protéines des embryons de cacaoyer. L'intérêt pour ces molécules est apparu compte tenu la difficulté de réussir l'embryogenèse somatique chez cette espèce. La réussite de la production des embryons somatiques dépend toujours des génotypes, et la réussite de la conversion de ces embryons en plantes entières est importante pour la valorisation des génotypes sélectionnés. C'est ainsi que la recherche sur l'implication de ce groupe de molécules l'embryogenèse du cacaoyer a été envisagée, aussi bien chez les embryons somatiques que zygotiques. Notre but était de déterminer l'implication éventuelle de ces molécules dans la conversion des cals en embryons et le développement de ces derniers.

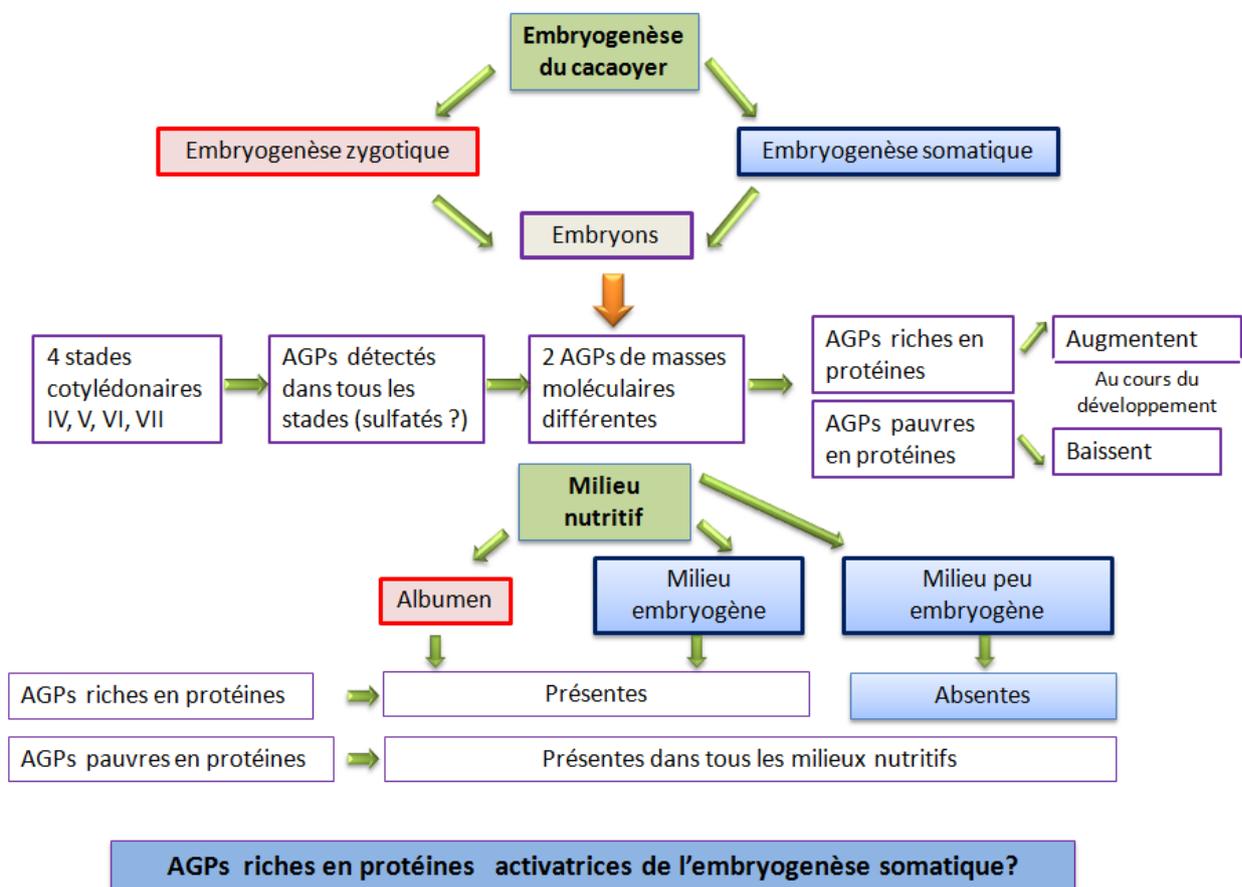
Nous avons tout d'abord défini des critères permettant de comparer, sur la même base, les embryons somatiques avec les zygotiques. Les stades de développement que nous avons identifiés ont fait l'objet d'une caractérisation morphologique, histologique et biochimique. Les critères définis constituent des éléments nouveaux, qui viennent compléter les données de la littérature qui permettent de différencier certaines étapes de ce processus.

Dans un premier temps, les AGPs ont été détectées par la technique de coloration au réactif de Yariv, et par immuno-détection. Les AGPs sulfatées sont mises en évidence chez les plantes à fleurs. Cette détection met en exergue une voie privilégiée du mécanisme d'action des AGPs au cours de l'embryogenèse. Elles ont été caractérisées par leur polarité et leur masse moléculaire. Les molécules candidats à la stimulation de l'embryogenèse somatique chez le cacaoyer, ont été identifiées par leur absence dans les milieux de culture peu-embryogènes. Les AGPs de cacaoyer sont en majorité hydrophiles, fortement glycosylée, de masse moléculaire élevée (>

670 kDa). La fraction potentiellement embryogène est très variable et contient plus de protéines que les autres fractions. Sa composition moléculaire évolue au cours du développement des embryons zygotiques et somatiques de cacaoyer.

Les fonctions assurées par les AGPs au cours du développement des embryons de cacaoyer ont été déduites de la variation de leur teneur dans les tissus. L'anatomie et la morphologie des différents stades de développement des embryons ont permis d'émettre des hypothèses. Les AGPs participeraient à la mise en place des cotylédons, à l'initiation de leur pigmentation, au développement du tissu vasculaire et à la mise en place des zones méristématiques.

Au cours de notre étude une technique relativement aisée et rapide d'analyse et de suivi des AGPs a été développée. La séparation par chromatographie d'exclusion stérique, associée à une double détection, aux UV à 215 nm et par fluorométrie Ex/Em : 221/350 nm, a permis de mettre en évidence la diversité des AGPs. L'hétérogénéité des fractions est basée soit sur leur composition en sucres, soit sur leur composition en acides aminés. Par contre, quelque soit l'échantillon, la masse moléculaire apparente est liée à l'importance du résidu protéique. La fraction la plus hétérogène est celle qui s'est avérée susceptible d'activer l'embryogenèse somatique. Elle serait régulée au cours du développement des embryons.



II. PERSPECTIVES

Nos résultats ouvrent des perspectives de recherche sur l'implication des AGPs, non seulement aux stades précoces d'initiation, mais à des stades embryonnaires plus avancés, dont la connaissance des mécanismes de développement est particulièrement appréciée dans le cadre de la production de *Theobroma cacao*. Dans ce contexte, les perspectives sont envisagées à court et plus long termes.

Perspectives à court terme : Immuno détection in situ des AGPs

Des travaux préliminaires de localisation des AGPs par immuno-fluorescence ont montré qu'elles sont abondantes dans le cortex et le système vasculaire. Ce marquage, obtenu avec l'anticorps LM14, a indiqué la présence des sites reconnus principalement dans la paroi, et avec une moindre intensité dans le cytoplasme des embryons de cacaoyer.

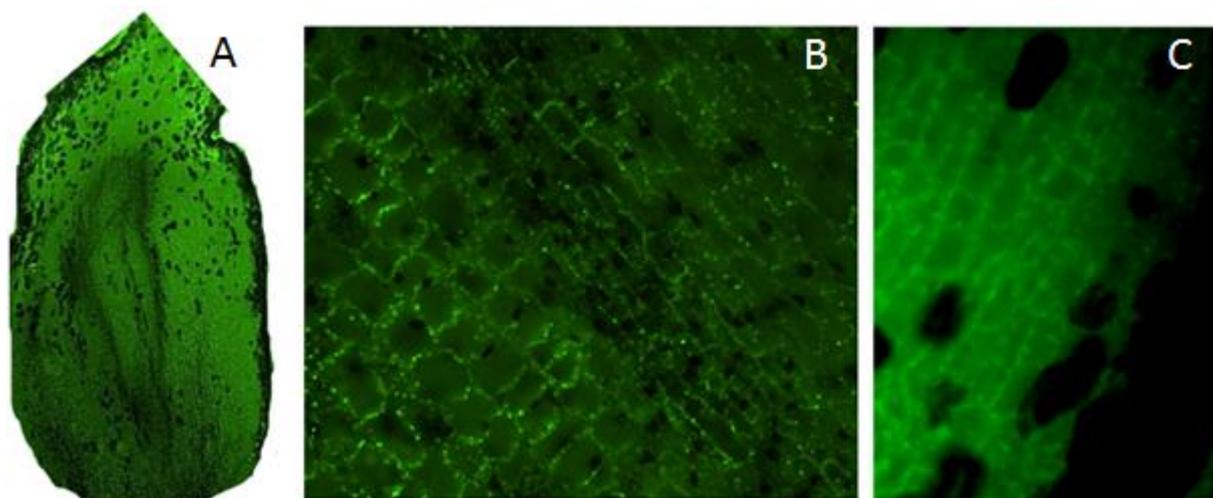


Figure 48 : Coupes longitudinales d'un embryon somatique (A) montrant des sites de marquage par immunofluorescence FITC essentiellement dans la paroi (B), anticorps LM 14; C, Témoin avec fluorescence non spécifique.

Cette technique de localisation pourra être utilisée pour étudier et comparer la localisation cellulaire des AGPs dans les différents types d'embryons et aux différents stades de développement. Elle permettra de mieux analyser les modifications qui accompagnent le développement des embryons sur le plan de la distribution des AGPs et de leur teneur. Ainsi une argumentation structure/fonction pourra être proposée.

La technique d'immuno-marquage à l'or a également été tentée pour étudier la localisation subcellulaire des AGPs dans les différents tissus embryonnaires. Cette analyse confirme la localisation pariétale, et indique également une distribution cytoplasmique et même vacuolaire de certaines AGPs dans l'albumen de cacaoyer.

La localisation subcellulaire des AGPs est un outil précis qui pourrait, en association avec des analyses biochimiques, donner des arguments permettant de mieux comprendre leur mécanisme d'action. Elle permettrait également d'étudier une possible interaction entre ces proteoglycanes et d'autres molécules pariétales au cours de l'embryogenèse.

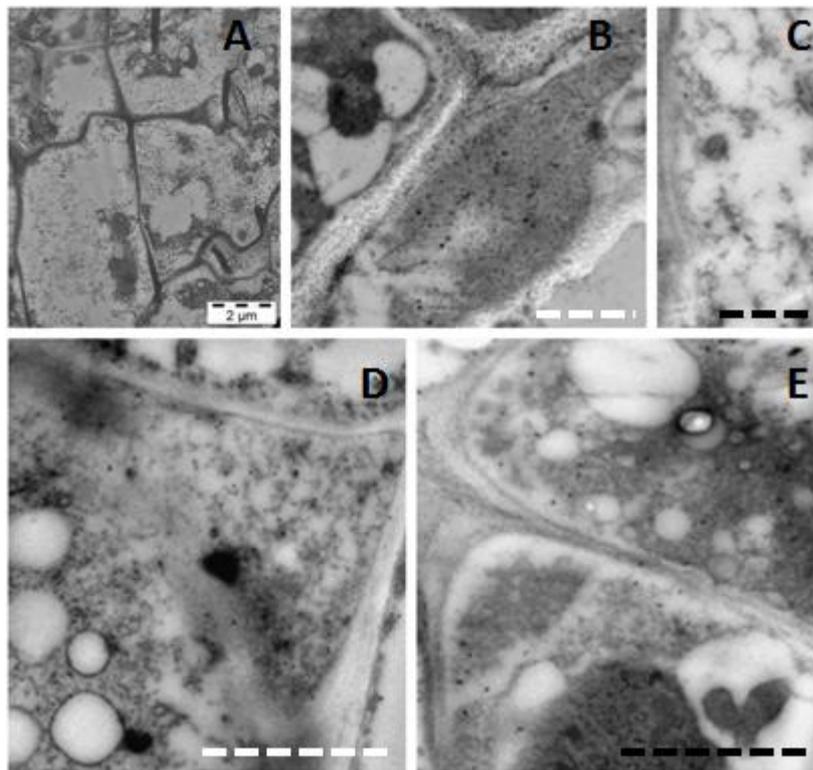


Figure 49 : Coupe ultra fine dans l'albumen d'un embryon zygotique du génotype SNK 630 au stade II. Inclusion dans la résine LRW et immunomarké à l'or (billes de 10 nm) anticorps JIM 8. A cellules entières de l'albumen (Barre 2 µm), B Vacuoleimmunomarkée (Barre 1 µm), C Témoin sans marquage (Barre 1 µm), Det E, Cytoplasme et paroi immunomarkés (Barre 2 µm).

Les analyses biochimiques seront poursuivies par la détection par infrarouge et spectroscopie de masse des groupements sulfatés dans les AGPs.

Perspectives à moyen et long termes

La suite de ce travail est l'analyse de la fraction d'AGPs impliquée dans le développement des embryons par MALDI/TOF(Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass

spectrometer). Un séquençage et une analyse génomique de la protéine permettrait d'identifier de manière plus précise l'AGPs impliquée dans l'embryogenèse. Une fois identifiée elle pourrait être produite par des cellules transformées pour une application industrielle. Il a en effet été démontré que les protéines issues de la séquence peptidique des AGPs activent l'embryogenèse.

De manière plus simple, l'application de nos résultats consisterait à mener une étude sur l'effet d'un apport exogène de la fraction activatrice de l'embryogenèse sur l'amélioration de ce processus chez le cacaoyer. Dans le cas d'une application à grande échelle la CES préparative pourrait être utilisée pour séparer les AGPs isolées. Elle permettrait de collecter de grande quantité des fractions.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- A -

- Acosta-Garcia, G., Vielle-Calzada, J.P., 2004. A classical arabinogalactan protein is essential for the initiation of female gametogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16 (10), pp. 2614-2628.
- Aime, M.C., Phillips-Mora, W., 2005. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. *Mycologia* 97 (5), pp. 1012-1022.
- Albenne, C., Canut, H., Boudart, G., Zhang, Y., San Clemente, H., Pont-Lezica, R., Jamet, E., 2009. Plant cell proteomics : mass spectrometry data, a trove for research on protein structure/function relationships. *Mol. Plant.* 2 (5), pp. 977-989.
- Alemanno, L., Berthouly, M., Micheaux-Ferrière N., 1996. Embryogénèse somatique du cacaoyer à partir des pièces florales. *Plant Rech. Dev.* 3, pp. 225-233.
- Alemanno, L., Berthouly, M., Micheaux-Ferrière N., 1997. A comparison between *Theobroma cacao* L., zygotic embryogenesis and somatic embryogenesis from floral explants. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 33, pp. 163-172.
- Alemanno, L., Ramos, T., Gargadene, A., Andary, C., Ferriere, N., 2003. Localization and identification of phenolic compounds in *Theobroma cacao* L. somatic embryogenesis. *Ann. Bot.* 92 (4), pp. 613-623.
- Alemanno, L., Devic, M., Niemenak, N., Sanier, C., Guilleminot, J., Rio, M., Verdeil, J.-L., Montoro, P., 2008. Characterization of leafy cotyledon1-like during embryogenesis in *Theobroma cacao* L. *Planta* 227 (4), pp. 853-866.
- Alverson, W.S., Whitlock, B.A., Nyffeler, R., Bayer, C., Baum, D.A., 1999. Phylogeny of the core Malvales: Evidence from *ndhF* sequence data. *Am. J. Bot.* 86 (10), pp. 1474-1486.

- Amefia Y.K., Cilas C., Djiekpor E.K., Partiot M., 1985. Vegetative propagation of the cocoa tree. Note on a method for obtaining cuttings with orthotropous rooting (*Theobroma cacao*). *Café Cacao Thé* 29 (2), 83-88.
- Aneja, M., Gianfagna, T., Ng, E., 1999. The roles of abscisic acid and ethylene in the abscission and senescence of cocoa flowers. *Plant Growth Regul.* 27 (3), pp. 149-155.
- Argout, X., Salse, J., Aury, J.M., Guiltinan, M.J., Droc, G., Gouzy, J., Allegre, M., Chaparro, C., Legavre, T., Maximova, S. N., Abrouk, M., Murat, F., Fouet, O., Poulain, J., Ruiz, M., Roguet, Y., Rodier-Goud, M., Barbosa-Neto, J.F., Sabot, F., Kudrna, D., Ammiraju, J.S., Carlson, J.E., Sallet, E., Schiex, T., Dievart, A., Kramer, M., Gelley, L., Shi, Z., Bérard, A., Viot, C., Boccara, M., Risterucci, A.M., Guignon, V., Sabau, X., Axtell, M.J., Ma, Z., Zhang, Y., Brown, S., Bourge, M., Golser, W., Song, X., Clement, D., Rivallan, R., Tahiri, M., Akasa, J.M., Pitollat, B., Gramacho, K., D'Hont, A., Brunel, D., Infante, D., Kebe, I., Costet, P., Wing, R., McCombie, W.R., Guiderdoni, E., Quetier, F., Panaud, O., Wincker, P., Boscs, S., Lanaud, C., 2011. The genome of *Theobroma cacao*. *Nature Genet.* 43 (2), pp. 101-108.
- Arlorio, M., Bottini, C., Travaglia, F., Locatelli, M., Bordiga, M., Coisson, J.D., Martelli, A., Tessitore, L., 2009. Protective activity of *Theobroma cacao* L. phenolic extract on AML12 and MLP29 liver cells by preventing apoptosis and inducing autophagy. *J. Agricult. Food Chem.* 57 (22), pp. 10612-10618.
- Assoumou, J., 1977. Culture *in vitro* of cambial tissue of cacao. *Nature*, 173, pp. 351-352.
- Avella, A.C., Delgado, L.F., Görner, T., Albasi, C., Galmiche, M., de Donato, Ph., 2010. Effect of cytostatic drug presence on extracellular polymeric substances formation in municipal wastewater treated by membrane bioreactor. *Bioresource Technol.* 101 (2), pp. 518-526

- B -

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

- Baluska, F., Volkmann D., Barlow, P.W., 1997. Nuclear components with microtubule organizing properties in multicellular eukaryotes : functional an evolutionary considerations. *Int. Rev. Cytol.* 175, pp. 91-135.
- Baron, K., Stasolla, C., 2008. The role of polyamines during *in vivo* and *in vitro* development. In *Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 44 (5), pp. 384-395.
- Basile, D.V., Ganjian, I., 2004. Beta-D-glucosyl and alpha-D-galactosyl Yariv reagents : synthese from p-nitrophenyl-D-glycosides by transfer reduction using ammonium formate. *J. Agri. Food Chem.* 52 (25), pp. 7453-7456.
- Ben Amar, A., Cobanov, P., Boonrod, K., Krczal, G., Bouzid, S., Ghorbel, A., Reustle, G.M., 2007. Efficient procedure for grapevine embryogenic suspension establishment and plant regeneration : role of conditioned medium for cell proliferation. *Plant Cell Rep.* 26 (9), pp. 1439-1447.
- Ben Amar, A., Cobanov, P., Ghorbel, A., Mliki, A., Reustle, G.M., 2010. Involvement of arabinogalactan proteins in the control of cell proliferation of *Cucurbita pepo* suspension cultures. *Biol. Plant.* 54 (2), pp. 321-324.
- Beltrán, O., De Pinto, G.L., Martínez, M., Picton, L., Cozic, C., Le Cerf, D., Muller, G., 2005. Fractionation and characterization of gum from *Acacia tortuosa*. Effect of enzymatic and alkaline treatments. *Carbohydr. Polymers* 62 (3), pp. 239-244.
- Blum, H., Beier, H., Gross, H.J., 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8, pp. 93-99.
- Borrone, J.W., Meerow, A.W., Kuhn, D.N., Whitlock, B.A., Schnell, R.J., 2007. The potential of the WRKY gene family for phylogenetic reconstruction: An example from the Malvaceae. *Mol. Phylogenet. Evol.* 44 (3), pp. 1141-1154.
- Boughanmi, N., Thibault, F., Decou, R., Fleurat-Lessard, P., Béré, E., Costa, G., Lhernould, S., 2010. NaCl effect on the distribution of wall ingrowth polymers and arabinogalactan in type A transfer cells of *Medicago sativa* Gabès leaves. *Protoplasma* 242 (1-4), pp. 68-80.
- Bourven, I., Costa, G., Guibaud, G., 2012. Qualitative characterization of the protein fraction of exopolymeric substances (EPS) extracted with EDTA from sludge. *Bioresource Technol.* 104, pp. 486-496.

- Burnette, W.N., 1981. «Western blotting» : electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* 12 (2), pp. 195-203.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 7 (72), pp. 115-125.
- Brady, L.J., Cvikovitch, D.G., Geric, C.M., Addison, M.N., Joyce, J.C., Crowley, P.J., Bleiweis, A.S., 1998. Deletion of the central proline-rich repeat domain results in altered antigenicity and lack of surface expression of the *Streptococcus mutans* P1 adhesin molecule. *Infect. Immun.* 66 (9), pp. 4274-4282.
- Braudeau, J., 1969. *Le cacaoyer*. Maisonneuve et Larousse, Paris (France), 304p.
- Brecker, L., Wicklein, D., Moll, H., Fuchs, E.C., Becker, W.-M., Petersen, A., 2005. Structural and immunological properties of arabinogalactan polysaccharides from pollen of timothy grass (*Phleum pratense* L.). *Carbohydr. Res.* 340 (4), pp. 657-663.

- C -

- Cai, S., Zhang, P., Zhu, L., Zhao, Y., Huang, H., 2011. A bio-aerosol detection technique based on tryptophan intrinsic fluorescence measurement. *Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering* 8311, art. no. 83110X.
- Cannesan M.A., Durand C., Burel C., Gangneux C., Lerouge P., Ishii, T., Laval, K., Follet-Gueye M., Driouich A., Vicré-Gibouin M., 2012. Effect of arabinogalactan proteins from the root caps of pea and *Brassica napus* on *Aphanomyces euteiches* zoospore chemotaxis and germination. *Plant Physiol.* 159 (4) , pp. 1658-1670.
- Cassab, G.I., 1998. Plant cell proteins. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, pp. 281-309.
- Chapman, A., Blervacq, A.-S., Vasseur, J., Hilbert, J.-L., 2000. Arabinogalactan-proteins in *Cichorium* somatic embryogenesis: Effect of β -glucosyl Yariv reagent and epitope localisation during embryo development. *Planta* 211 (3), pp. 305-314.
- Chavèz Montes, R.A., Ranocha, P., Martinez, Y., Minic, Y., Jouanin, L., Marquis, M., Saulnier, L., Fulton, L.M., Cobbett, C.S., Bitton, F., Renou, J-P., Jauneau, A., Goffner, D.,

2008. Cell wall modification in *Arabidopsis* plant with altered α -I-arabinofuranosidase activity. *Plant Physiol.* 147 (1), pp. 63-67.
- Cheesmann, E.E., 1944. Notes on the nomenclature, classification and possible relationships of cocoa population. *Trop. Agricult.* 21, pp. 144-159.
- Chen, W., Westerhoff, P., Leenheer, J.A., Booksh, K., 2003. Fluorescence excitation-emission matrix regional integration to quantify spectra for dissolved organic matter environmental. *Sci. Technol.* 37 (24), pp. 5701-5710
- Cilas C., 1991. Estimation of some genetic parameters in different cocoa cross schemes. *Café Cacao Thé* 35 (1), 3-14.
- Clarke, A.E., Anderson, R.L., Stone, B.A., 1979. Form and function of arabinogalactans and arabinogalactan-proteins. *Phytochem.* 18 (4), pp. 521-540.
- Coimbra, S., Costa, M., Jones, B., Mendes, M.A., Pereira, L.G., 2009. Pollen grain development is compromised in *Arabidopsis* *agp6 agp11* null mutants. *J. Exp. Bot.* 60 (11), pp. 133-142.
- Crosgrove, D., 1999. Enzymes and others agents that enhance cell wall extensibility. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 50, pp. 391-417.
- Cuatrecasas, J., 1964. *Cacao and its allies: a taxonomic revision of the genus Theobroma*. United States National Museum, Smithsonian Institution, 35, pp. 379-614.

- D -

- Darjania, L., Ichise, N., Ichikawa, S., Okamoto, T., Okuyama, H., Thompson Jr., G.A. , 2002. Dynamic turnover of arabinogalactan proteins in cultured *Arabidopsis* cells. *Plant Physiol. Biochem.* 40 (1), pp. 69-79.
- Dangou, J.S., Hocher, V., Ferrière, N., Fulcheri, C., Morard, P., Alemanno, L., 2002. Histological and biochemical characterization of *Theobroma cacao* L. endosperm during seed development. *Seed Sci. Res.* 12 (2), pp. 91-100.
- Deheuvels, O., Decazy, B., Perez, R., Roche, G., Amores, F., 2004. The first Ecuadorean 'Nacional' cocoa collection based on organoleptic characteristics. *Trop. Sci.* 44 (1), pp. 23-27.

- Deepak, S., Shailasree, S., Kini, R.K., Muck, A., Mithöfer, A., Shetty, S.H., 2010. Hydroxyproline-rich glycoproteins and plant defence. *J. Phytopathol.* 158 (9), pp. 585-593.
- De Oliveira Santos, M., Romano, E., Yotoko, K.S.C., Tinoco, M.L.P., Dias, B.B.A., Aragão, F.J.L., 2005. Characterisation of the cacao somatic embryogenesis receptor-like kinase (SERK) gene expressed during somatic embryogenesis. *Plant Sci.* 168 (3), pp. 723-729.
- De Silva, V., Bostwick, D., Burns, K.L., Oldham, C.D., Skryabina, A., Sullards, M.C., Wu, D., Zhang, Y., May, S.W., Pullman, G.S., 2008. Isolation and characterization of a molecule stimulatory to growth of somatic embryos from early stage female gametophyte tissue of loblolly pine. *Plant Cell Rep.* 27, pp. 633-646.
- Dillinger, T.L., Barriga, P., Escárcega, S., Jimenez, M., Lowe, D.S., Grivetti, L.E., 2000. Food of the Gods: Cure for humanity? A cultural history of the medicinal and ritual use of chocolate. *J. Nutrition* 130 (8 SUPPL.), pp. 2057S-2072S.
- Ding, L., Zhu, J.K., 1997. A role for arabinogalactan-proteins in root epidermal cell expansion. *Planta* 203, pp. 289-294.
- Djocgoue, P.F., Boudjeko, T., Mbouobda, H.D., Nankeu, D.J., El Hadrami, I., Omokolo, N.D., 2007. Heritability of phenols in the resistance of *Theobroma cacao* against *Phytophthora megakarya*, the causal agent of black pod disease. *J. Phytopathol.* 155 (9), pp. 519-525
- Dodeman, V.L., Ducreux, G., Kreis, M., 1997. Zygotic embryogenesis *versus* somatic embryogenesis. *J. Exp. Bot.* 48, pp. 1493-1509.
- Dos Santos, A.L.W., Wiethölter, N., El Gueddari, N.E., Moerschbacher, B.M., 2006. Protein expression during seed development in *Araucaria angustifolia*: Transient accumulation of class IV chitinases and arabinogalactan proteins. *Physiol. Plant.* 127 (1), pp. 138-148.
- Driver, J. A., Kuniyuki, A.H., 1984. *In vitro* propagation of paradox walnut root stock. *HortSci.* 19, pp. 507-509.
- Dumas, C., Rogowsky P., 2008. Fertilization and early seed formation. *C. R. Biol.* 331 (10), pp. 715-725.

- E -

- Egelund, J., Ellis, M.A., Doblin, M.S., Bacic, A., 2010. The genes and enzymes of CAZy GT-family-31 : toward unrevealing the function(s) of the novel plant glycosyltransferases family members. *Ann. Plant Rev.*, Vol. 41 Plant polysaccharides. Blackwell publishing, Oxford.
- Egertsdotter, U., Von Arnold, S., 1995. Importance of arabinogalactan proteins for the development of somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies*). *Physiol. Plant.* 93, pp. 334-345.
- Egertsdotter, U., 1996. Regulation of somatic embryo development in Norway spruce (*Picea abies*). *Agronomy* 16 (10), pp. 603-608.
- Egertsdotter, U., Von Arnold, S., 1998. Development of somatic embryos in Norway spruce (*Picea abies*). *J. Exp. Bot.* 49, pp. 155-162.
- Ellis, M., Egelund, J., Schultz, C., Bacic, A., 2010. Arabinogalactan-proteins (AGPs) : key regulator at the cell surface? *Plant Physiol.* 153, pp. 403-419.
- Emile, M., Nicolas, N., Soupi, N.M.S., Abdourahamane, S., Denis, O.N., 2007. Implication of cysteine, glutathione and cysteine synthase in *Theobroma cacao* L. zygotic embryogenesis. *Biotechnology*, 6 (1), pp. 129-137.
- Emons, A.M.C., 1994. Somatic embryogenesis : cell biological aspects. *Acta Bot. Neerl.* 43, pp.1-14.
- Ermel, F.F., Follet-Gueye M.L., Cibert C., Vian B., Morvan C., Catesson A.M., Goldberg R., 2000. Differential localization of arabinan and galactan side chains of rhamnogalacturonan 1 in cambial derivatives. *Planta* 210 (5), pp. 732-740.
- Esan, E.B., 1975. Tissue culture studies on cacao (*Theobroma cacao* A supplementation of current research. *Proc 5th Int. Cacao Res. Conf. Ibadan : Cacao Res. Inst. Nigeria;* 1977, pp. 116-125.
- Eskes, A., Lanaud, C., 1997. Le cacaoyer. In : *L'amélioration des plantes tropicales*, CIRAD, Montpellier, France, pp. 116-125.
- Estevez, J.M., Fernández, P.V., Kasulin, L., Dupree, P., Cianca M. 2009. Chemical and *in situ* characterization of macromolecular components of the cell walls from the green seaweed *Codium fragile*. *Glycobiology* 19 (3), pp. 212-228.

- F -

- Fairbanks G, Steck TL, Wallach DF., 1971. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* 10 (13), pp. 2606-2617.
- Fehér, A., Pasternak, T.P., Dudits, D., 2003. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell, Tissue, Organ, Culture* 74 (3), pp. 201-228.
- Fergusson, C. Teeri T.T., Siika-aho, M., Read, S.M., Bacic, A., 2008. Location of cellulose and callose in pollen tubes and grains of *Nicotiana tabacum*. *Planta* 206, pp. 452-460.
- Figueira, A., Janick, J., 1993. Development of nucellar somatic embryos of *Theobroma cacao*. *Acta Hort.* 336, pp. 231-238.
- Fincher G.B., Stone B.A., 1983. Arabinogalactan-proteins : Structure, biosynthesis and function. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 34, pp. 47-70.
- Fras, A., Smolen, B., Maluszynska, J., 2008. Vascularization of zygotic and somatic embryos of *Arabidopsis thaliana*. *Acta Biol. Cracoviensia Series Bot.* 50 (2), pp. 43-48.
- Frølund, B., Palmgren, R., Keiding, K., Nielsen, P.H., 1996. Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Water Research* 30 (8), pp. 1749-1758.
- Fry, S.C., Aldington, S., Hetherington, P.R., Aitken, J., 1993. Oligosaccharides as signals and substrates in the plant cell wall. *Plant Physiol.* 103, pp. 1-5.

- G -

- Gane, A.M., Craik, D., Munro, S.L., Holett G.J., Clarke A. E., Bacic, A., 1995. Structural analysis of the carbohydrate moiety of arabinogalactan-proteins from stigmas and styles of *Nicotiana alata*. *Carbohydr. Res.* 277, pp. 67-85.
- Gao, M., Kieliszewski, M.J., Lamport, D.T.A., Showalter, A.M., 1999. Isolation, characterization and immunolocalization of a novel, modular tomato arabinogalactan-protein corresponding to the LeAGP-1 gene. *Plant Journal* 18 (1) , pp. 43-55.

- Gao, M Showalter A.M., 1999. Yariv reagent treatment induces programmed cell death in *Arabidopsis* cell cultures and implicates arabinogalactan protein involvement. *Plant J.* 19, pp. 321-331.
- Gao, M., Showalter A.M., 2000. Immunolocalization of LeAGP-1, a modular arabinogalactan-protein, reveals its developmentally regulated expression in tomato. *Planta* 210, pp. 865-874.
- Gargiulo, A.M., Dall'aglio, C., Coliolo, P., Ceccarelli, P., Pedini, V., 2000. Complex carbohydrate histochemistry and ultracytochemistry of the sheep lacrimal gland. *Anatomia, Histologia, Embryologia* 29 (1), pp. 19-23.
- Gaspar, Y., Johnson, K.L., Mckenna, J.A., Bacic, A., Schultz, C.J., 2001. The complex structures of arabinogalactan-proteins and the journey towards understanding function. *Plant Mol. Biol.* 47 (1-2), pp. 161-176.
- Gaspar, Y.M., Nam, J., Schultz, C.J., Lee, L.-Y., Gilson, P.R., Gelvin, S.B., Bacic, A., 2004. Characterization of the *Arabidopsis* lysine-rich arabinogalactan-protein AtAGP17 mutant (rat1) that results in a decreased efficiency of *Agrobacterium* transformation. *Plant Physiol.* 135 (4), pp. 2162-2171.
- Gervais M., 1981. Greffage du cacaoyer en fente terminale. *Café Cacao Thé* 25 : 55-59.
- Guiltinan, M., Maximova, S. 2000. Recent advances in the tissue culture of cocoa from somatic embryos to BENTWOOD Gardens-a short reviews. In: *New technologies and cocoa breeding. INGENIC. Malaysia.* pp. 157-162.
- Gilson, P., Gaspar, Y.M., Oxley, D., Youl, J.J., Bacic, A., 2001. NaAGP4 is an arabinogalactan protein whose expression is suppressed by wounding and fungal infection in *Nicotiana glauca*. *Protoplasma* 215 (1), pp. 128-139.
- Göllner, E.M., Ichinose, H., Kaneko, S., Blaschek, W., Classen, B., 2011. An arabinogalactan-protein from whole grain of *Avena sativa* L. belongs to the wattle-blossom type of arabinogalactan-proteins. *J. Cereal Sci.* 53 (2), pp. 244-249.
- Göllner, E.M., Wolfgang, B., Birgit, C. 2010 Structural investigations on arabinogalactan-protein from wheat, isolated with Yariv reagent. *J. Agri. Food Chem.* 58 (6), pp. 3621-3626.

- Görg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Harder, A., Schiebe, B., Wildgruber, R., Weiss, W., 2000. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 21 (6), pp. 1037-1053.
- Görner, T., De Donato, P., Ameil, M.-H., Montarges-Pelletier, E., Lartiges, B.S., 2003. Activated sludge exopolymers: Separation and identification using size exclusion chromatography and infrared micro-spectroscopy. *Water Research* 37 (10), pp. 2388-2393.
- Górska-Koplińska, K., Górecki, R., Lahuta, L., Anna, Z.-S., 2010. A comparison of soluble sugar accumulation in zygotic and somatic pea embryos. *Polish J. Nat. Sci.* 25 (4), pp. 313-322.

- H -

- Hannock, C.N., Kent L., McClure B.A., 2005. The stylar 120 kDa glycoprotein is required for S-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Plant J.* 43, pp. 716-723.
- Hermann, E.M., Lamb, C.J., 1992. Arabino-rich glycoproteins are localized on the cell surface and in intravascular multivesicular bodies. *Plant Physiol.* 98, pp. 264-272.
- Hierl, G., Vothknecht, U., Gietl, C., 2012. Programmed cell death in *Ricinus* and *Arabidopsis*: The function of KDEL cysteine peptidases in development. *Physiol. Plant.* 145 (1), pp. 103-113.
- Hijazi M., 2011. Caractérisation structural et fonctionnelle d'AGP31, une glycoprotéine atypique de la paroi chez *Arabidopsis Thaliana*. Thèse d'Université, Toulouse, 159 p.
- Hu, Y., Qin, Y., Zhao, J., 2006. Localization of an arabinogalactan protein epitope and the effects of Yariv phenylglycoside during zygotic embryo development of *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasma* 229, pp. 21-31.

- I -

- Ikeda, M., Kamada, H. 2005 Comparison of molecular mechanisms of somatic and zygotic embryogenesis. *Plant Cell Monographs* 2, pp. 51-68.

Iwaro, A.D., Sreenivasan, T.N., Umaharan, P., 1997. *Phytophthora* resistance in cacao (*Theobroma cacao*): Influence of pod morphological characteristics. *Plant Pathol.* 46 (4), pp. 557-565.

- J -

Jamet, E., Canut, H., Boudart, G., Pont-Lezica, R.F., 2006. Cell wall proteins : a new insight through proteomics. *Trends Plant Sci.* 11 (1), pp. 177-179.

Johnson, K.L., Jones, B.J., Bacic, A., Schultz, C.J., 2003. The fasciclin-like arabinogalactan proteins of *Arabidopsis*. A multigene family of putative cell adhesion molecules. *Plant Physiol.* 133 (4), pp. 1911-1925.

Jürgens, G., 1995. Plant cytokinesis : fission by fusion. *Trends Cell Biol.* 15, pp. 277-283.

Jürgens, G., 1996. Cell division and morphogenesis in angiosperm embryogenesis. *Seminars Cell Develop. Biol.* 7 (6), pp. 867-872.

- K -

Kamerling, J.P., Gerwig, G.S., Vliegthart J.F.G., Clamp, J.R., 1975. Characterization by gas liquid chromatography mass spectrometry of permethylsilyl glycosides obtained in methanolysis of glycoproteins and glycolipids. *Biochemistry J.* 151, pp. 491-495.

Karami, O., Aghavaisi, B., Mahmoudi Pour, A., 2009. Molecular aspects of somatic-to-embryogenic transition in plants. *J. Chem. Biol.* 2 (4), pp. 177-190.

Karami, O., Deljou, A., Esna-Ashari, M., Ostad-Ahmadi, P., 2008. Secondary somatic embryogenesis in carnation (*Dianthus caryophyllus*). *Plant Cell, Tissue, Organ, Culture.* 92, pp. 273-280.

Karami, O., Saidi A., 2010. The molecular basis for stress-induced acquisition of somatic embryogenesis. *Mol. Biol. Rep.* 37 (5), pp. 2493-2507.

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

Kieliszewski, M.J., O'Neill, M., Leykam, J., Orlando, R., 1995. Tandem mass spectrometry and structural elucidation of glycopeptides from a hydroxyproline-rich plant cell wall

- glycoprotein indicate that contiguous hydroxyproline residues are the major sites of hydroxyproline O-arabinylation. *J. Biol. Chem.* 270 (6), pp. 2541-2549.
- Kieliszewski, M.J., Shpak, E., 2001. Synthetic genes for the elucidation of glycosylation codes for arabinogalactan-proteins and other hydroxyproline-rich glycoproteins. *Cell. Mol. Life Sci.* 58 (10), pp. 1386-1398.
- Kim, I., Hempel, F.D., Sha, K., Pfluger, J., Zambryski, P.C., 2002. Identification of a developmental transition in plasmodesmatal function during embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 129 (5), pp. 1261-1272.
- Kinoshita, T., Fujita, M., Maeda, Y., 2008. Biosynthesis, remodelling and functions of mammalian GPI-anchored proteins: recent progress. *J. Biochem.* 144, pp. 287-294.
- Knox, J.P., Day, S., Roberts, K., 1989. A set of cell surface glycoproteins forms an early marker of cell position, but not cell type, in the root apical meristem of *Daucus carota* L. *Dev.* 106, pp. 47-56.
- Knox, J.P., Linstead, P. J., Peart, J., Cooper, C., Roberts, K., 1991. Developmentally-regulated epitopes of cell surface arabinogalactan-proteins and their relation to root tissue pattern formation. *Plant J.* 1, pp. 317-326.
- Knox, J.P., 1992. Cell adhesion, cell separation and plant morphogenesis. *Plant J.* 2, pp. 137-141.
- Kouakou, T.H., Waffo-Téguo, P., Kouadio, Y.J., Valls, J., Richard, T., Decendit, A., Méryllon, J.-M., 2007. Phenolic compounds and somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell, Tissue, Organ, Culture* 90 (1), pp. 25-29.
- Koko L., Koffi N., Konan A., 2011. Multiplication végétative du cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) par la technique de bouturage direct sous tunnel plastique. *J. Applied Biosciences* 46: 3124– 3132.
- Kottakis, F., Lamari, F., Matragkou, Ch., Zachariadis, G., Karamanos, N., Choli-Papadopoulou, T., 2008. Arabino-Galactan Proteins from *Pistacia lentiscus* var. chia: Isolation, characterization and biological function. *Amino Acids* 34 (3), pp. 413-420.
- Kreuger, M., Vanholst, G.J., 1995. Arabinogalactan-protein epitopes in somatic embryogenesis of *Daucus carota* L. *Planta* 197, pp. 135-141.

- L -

- Lachenaud, Ph., Paulin, D., Ducamp, M., Thevenin, J.-M., 2007. Twenty years of agronomic evaluation of wild cocoa trees (*Theobroma cacao* L.) from French Guiana. *Sci. Hort.* 113 (4), pp. 313-321.
- Lafarguette, F., Leplé, J.C., Déjardin, A., Laurans, F., Costa, G., Lesage-Dascauses, M.C., Pilate, G., 2004. Poplar genes encoding fasciclin-like arabinogalactan proteins are highly expressed in tension wood. *New Phytol.* 164, pp. 107-121.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259), pp. 680-685.
- Lampert, D.T.A., Kieliszewski M.J., 2006. Salt stress upregulates periplasmic arabinogalactan-proteins using salt stress to analyse AGP function. *New Phytol.* 169, pp. 479-492.
- Lara-Chavez, A., Flinn, B.S., Egertsdotter, U., Sederof, R., 2011. Initiation of somatic embryogenesis from immature zygotic of oocarpa pine (*Pinus oocarpa* Schiede ex Schlechtendal). *Tree Physiol.* 31 (5), pp. 539-554.
- Ledwoń, A., Gaj, M.D., 2011. LEAFY COTYLEDON1, FUSCA3 expression and auxin treatment in relation to somatic embryogenesis induction in *Arabidopsis*. *Plant Growth Regul.* 65 (1), pp. 157-167.
- Lee, K.J.D., Sakata, Y., Mau, S.L., Pettolino, F., Bacic, A., Quatrano, R.S., Knight, C.D., Knox, J.P., 2005. Arabinogalactan proteins are required for apical cell extension in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Cell* 17, pp. 3051-3065.
- Lee, C.B., Swatek, K.N., McClure, B., 2008. Pollen proteins bind to the C-terminal domain of *Nicotiana alata* pistil arabinogalactan proteins. *J. Biol. Chem.* 283, pp. 26965-26973.
- Li, Z., Traoré, A., Maximova, S., Guiltinan, M.J., 1998. Somatic embryogenesis and plant regeneration from floral explants of cacao (*Theobroma cacao* L.) using thidiazuron. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 34, pp. 293-299.
- Li, L., Qu, R., 2002. *In vitro* somatic embryogenesis in turf-type bermudagrass : roles of abscisic acid and gibberellic acid and occurrence of secondary somatic embryogenesis. *Plant Breed.* 121, pp. 155-158.

- Likhtenshtein, G.I., 2009. Novel fluorescent methods for biotechnological and biomedical sensing : assessing antioxidants, reactive radicals, NO dynamics, immunoassay, and biomembranes fluidity. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 152 (1), pp. 135-155.
- Litz, R.E., 1986. Tissue culture studies with *Theobroma cacao*. In : Dimick, P.S., ed. Cacao biotechnology symposium. Department of Food Science, College of agriculture, The Pennsylvania State University, University Park, PA, pp. 111-120.
- Lopez-Baez, O., Bollon, H., Eskes, A.B., Pietard, N., 1993. Embryogénèse somatique de cacaoyer *Theobroma cacao* L. à partir des pièces florales. *Acad. Sci. Paris, série III.* 316, pp. 549-585.
- Lucau-Danila, A., Laborde, L., Legrand, S., Huot, L., Hot, D., Lemoine, Y., Hilbert, J.L., Hawkins, S., Quillet, M.C., Hendriks, T., Blervacq, A.S., 2010. Identification of novel genes potentially involved in somatic embryogenesis in chicory (*Cichorium intybus* *BMC Plant Biol.* 10. 122.
- Luthria, D.L., Pastor-Corrales, M.A., 2006. Phenolic acids content of fifteen dry edible bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. *J. Food Composition Analysis* 19 (2-3), pp. 205-211.

- M -

- Ma, H., Zhao, J., 2010. Genome-wide identification, classification, and expression analysis of the arabinogalactan protein gene family in rice (*Oryza sativa* J. *Exp. Bot.* 61 (10), pp. 2647-2668.
- Malainine, M. E., inventor. September 7, 2007. An arabinogalactan protein having the property of absorbing fats and method for obtaining this arabinogalactan protein. World Intellectual Property Organization Publication N° WO/2007/100236 (A2).
- Mashiguchi, K., Yamaguchi, I., Suzuki, Y., 2004. Isolation and identification of glycosylphosphatidylinositol-anchored arabinogalactan proteins and novel β -glucosyl yariv-reactive proteins from seeds of rice (*Oryza sativa*). *Plant and Cell Physiology* 45 (12) , pp. 1817-1829.
- Maurer, J.B.B., Bacic A., Pereira-Netto A.B., Donatt L., Zawadzki-Baggio, S.F., Pettolino, F.A., 2010. Arabinogalactan-proteins from cell suspension cultures of *Araucaria angustifolia*. *Phytochemistry* 71 (11-12), 1400-1409.

- Maximova, S.N., Alemanno, L., Young, A., Ferrière, N., Traoré, A., Gultinan, M.J., 2002. Efficiency, genotypic variability, and cellular origin of primary and secondary somatic embryogenesis of *Theobroma cacao* L. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 38, pp. 252-259.
- McMahon P., Iswanto A., Susilo A.W., Sulistyowati E., Wahab A., Imron M., Purwantara A., Mufrihati E., Dewi V.S., Lambert S., Guest D., Keane P., 2009. On-farm selection for quality and resistance to pest/diseases of cocoa in Sulawesi: (i) performance of selections against cocoa pod borer, *Conopomorpha cramerella*. *Internat. J. Pest Management* 55 (4), pp. 325-337.
- Meinhardt, L.W., Rincones, J., Bailey, B.A., Aime, M.C., Griffith, G.W., Zhang, D., Pereira, G.A.G., 2008. *Moniliophytophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cacao: What's new from this old foe?. *Mol. Plant Pathol.* 9 (5), pp. 577-588.
- Micheli, F., Gultinan, M., Gramacho, K.P., Wilkinson, M.J., Figueira, A.V.D.O., Cascardo, J.C.D.M., Maximova, S., Lanaud, C., 2010. Functional genomics of cacao. *Advances Bot. Res.* 55 (C), pp. 119-177.
- Minyaka, E., Niemenak, N., Fotso, Sangare, N.D., Omokolo, N.D., 2008. Effect of MgSO₄ and K₂SO₄ on somatic embryo differentiation in *Theobroma cacao* L. *Plant Cell, Tissue, Organ, Culture* 94 (2), pp. 149-160.
- Minyaka, E., Niemenak N., Koffi Kouablan E., Issali E. A., Sangare A., Omokolo Ndoumou D., 2008. Sulphate Supply Promotes Somatic Embryogenesis in *Theobroma cacao* L. *J. Biol. Sci.* 8 (2): 306-313.
- Mishra, S., Sanyal, I., Amla, D.V. , 2012. Changes in protein pattern during different developmental stages of somatic embryos in chickpea. *Biol. Plant.* 56 (4), pp. 613-619.
- Mollet, J.C., Kim, S., Jaugh, G.Y., Lord, E.M., 2002. Arabinogalactan proteins, pollen tube growth, and the reversible effects of Yariv phenylglycoside. *Protoplasma* 219 (1-2), pp. 89-98.
- Moller, I., Sorensen, I., Bernal, A.J., Blaukopf, C., Lee, K., Obro, J., Pettolino, F., Roberts, A., Mikkelsen, J.D., Knox, J. ., Bacic, W.G.T., 2007. High-throughput mapping of cell

- wall polymers within and between plants using novel microarrays. *Plant J.* 50, pp. 1118-1128.
- Montreuil, J., Bouquelet, S., Debray, H., Fournet, B., Spik, G., Strecker, G., 1986. Glycoproteins. Dans «Carbohydrate analysis, a practical approach». Chaplin M. F. and Kennedy (Eds) ; IRL Press Oxford, Washington DC., pp. 143-204.
- Motamayor, J.C., Risterucci, A.M., Lopez, P.A., Ortiz, C.F., Moreno, A., Lanaud, C., 2002. Cacao domestication I: The origin of the cacao cultivated by the Mayas. *Heredity* 89 (5), pp. 380-386.
- Motamayor, J.C., Lachenaud, P., Da Silva e Mota, J.W., Loor, R., Kuhn, D.N., Brown, J.S., Schnell, R.J., 2008. Geographic and genetic population differentiation of the amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao* L). *PLoS ONE* 3 (10), e331.
- Motose, H., Sugiyama, M., Fukuda, H., 2001. An arabinogalactan protein(s) is a key component of a fraction that mediates local intracellular communication involved in tracheary element differentiation of *Zinnia* mesophyll cells. *Plant Cell Physiol.*, 42, pp. 129-137.
- Motose, H., Sugiyama, M., Fukuda, H., 2004. A proteoglycan mediates inductive interaction during plant vascular development. *Nature* 429 (6994), pp. 873-878.
- Moussavi A., Hotta Y., 2005. Glycine-rich proteins: A class of novel proteins. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 120, pp. 169-174.
- Muller, E., Jacquot, E., Yot, P., 2001. Early detection of cacao swollen shoot virus using the polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 93 (1-2), pp. 15-22.
- Munnik, T., Irvine R.F., Musgrave A., 1998. Phospholipid signalling in plants. *Biochem. Biophys. Acta* 1389 (3), pp. 222-272.
- Mutwill, M., Debolt, S., Persson, S., 2008. Cellulose synthesis : a complex complex. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11 (3), pp. 252-257.

- N -

- Niemenak, N., Saare-Surminski, K., Rohsius, C., Omokolo N.D., Lieberei, R., 2008. Regeneration of somatic embryos in *Theobroma cacao* L. in temporary immersion

bioreactor and analyses of free amino acids in different tissues. *Plant Cell Rep.* 27 (4), pp. 667-676.

Niemenak, N., Awah, T.M., Lieberei, R., 2012. Establishment of suspension culture in *Theobroma cacao* and polyamines associated with cacao embryogenesis. *Plant Growth Regul.* 67 (1), pp. 1-8.

Noah, A.M., Niemenak, N., Sunderhaus, S., Haase, C., Omokolo, D.N., Winkelmann, T., Braun, H.P., 2013. Comparative proteomic analysis of early somatic and zygotic embryogenesis in *Theobroma cacao* L.. *J. Proteomics* 14 (78), pp. 123-133.

Nothnagel, E.A., 1997. Proteoglycans and related component in plant cells. *Int. Rev. Cytol.* 174, pp. 195-291.

Nyassé, S., Grivet, L., Risterucci, A.M., Blaha, G., Berry, D., Lanaud, C., Despréaux, D., 1999. Diversity of *Phytophthora megakarya* in Central and West Africa revealed by isozyme and RAPD markers. *Mycol. Res.* 103 (10), pp. 1225-1234.

- O -

O'Neill, M.A., Albersheim, P., Darvill, A., 1990. The pectic polysaccharides of primary cell walls. Dans : *Methods in plant biochemistry*, Dey and Harborne (eds) ; *Carbohydrates*, Dey (ed) pp. 415-441. Academic Press, London.

O'Neill, M.A., Ishii T., Albersheim, P. Darvill, A.G., 2004. Rhamnogalactacturonan II : structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, pp. 109-139.

Ochatt, S.J., 2010. *In vitro* production of sweet peas (*Lathyrus odoratus* L.) via axillary shoots. *Methods Mol. Biol.* 589, pp. 293-301.

Oka, T., Saito, F., Shimma, Y.L., Yoko, O.T., Nomura, Y., Matsuoka, K., 2010. Characterization of endoplasmic reticulum-localized UDP-D-galactose hydroxyproline O-galactosyltransferase using synthetic peptide substrates in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 152, pp. 332-340.

Omokolo, N.D., Tsala, N.G., Niemenak, N., 1997. Phenol content, acidic peroxidase and IAA-oxidase during somatic embryogenesis in *Theobroma cacao* L.. *Biol. Plant.* 39, pp. 337-347.

- Ogata, Y., Iizuka, M., Nakayama, D., Ikeda, M., Kamada, H., Koshihara, T., 2005. Possible involvement of abscisic acid in the induction of secondary somatic embryogenesis on seed-coat-derived carrot somatic embryos. *Planta* 221 (3), pp. 417-423.
- Orlean, P., Menon, A.K., 2007. GPI anchoring of protein in yeast and mammalian cells, or : how we learned to stop worrying and love glycosphospholipids. *J. Lipid Res.* 48, pp. 993-1011.
- Osman, M.E., Menzies, A.R., Williams, P.A., Phillips, G.O., Baldwin, T.C., 1993. The molecular characterisation of the polysaccharide gum from *Acacia Senegal*. *Carbohydr. Res.* 246, pp. 303-318
- Ozaki, S., Kitamura, S., inventors. November 10, 2005. Novel arabinogalactan, substance with antidiabetic activity and method of uses thereof. World Intellectual Property Organization Publication N° WO/2005/105852 (A1).

- P -

- Palin, R., Geitmann, A., 2012. The role of pectin in plant morphogenesis. *Biosystems* 109 (3), pp. 397-402.
- Pan, X., Yang, X., Lin, G., Zou, R., Chen, H., Samaj, J., Xu, C., 2011. Ultrastructural changes and the distribution of arabinogalactan proteins during somatic embryogenesis of banana (*Musa spp.* AAA cv. 'Yueyoukang &'). *Physiol. Plant.* 142, pp. 372-389.
- Panaia, M., Bunn, E., McComb, J., 2011. Primary and repetitive secondary somatic embryogenesis of *Lepidosperma drummondii* (Cyperaceae) and *Baloskion tetraphyllum* (Restionaceae) for land restoration and horticulture. *In Vitro Cell. Develop. Biol. Plant* 47 (3), pp. 379-386.
- Pang, J.T.-Y., 2006. Yield efficiency in progeny trials with cocoa. *Exp. Agriculture* 42 (3), pp. 289-299.
- Pang, J.T.-Y., Lockwood, G., 2008. A re-interpretation of hybrid vigour in cocoa. *Exp. Agriculture* 44 (3), pp. 329-338.
- Patnaik, D., Khurana, P., 2001. Germins and germin like proteins : an overview. *Indian J. Exp. Biol.* 39 (3), pp. 191-200.

- Paulin D., 1994. Les méthodes statistiques des essais de sélection, stratégies d'amélioration des plantes pérennes. In: Biométrie et génétique quantitative. CIRAD, Montpellier (France). pp. 243-257.
- Pien, S., Wyrzykowska, J., McQueen-Mason, S., Smart, C., Fleming, A., 2001. Local expression of expansin induces the entire process of leaf development and modifies leaf shape. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 98 (20), pp. 11812-11817.
- Pennell, R.I., Janniche, L., Kjellbom, P., Scofield, G.N., Peart, J.M., Roberts, K., 1991. Developmental regulation of a plasma membrane arabinogalactan protein epitope in oil seed rape flowers. Plant Cell 3, pp. 1317-1326.
- Pennell, R.I., Janniche, L., Scofield, G.N., Booj H., de Vries S.C., Roberts, K., 1992. Identification of a transitional cell state in the developmental pathway to carrot somatic embryogenesis. J. Cell Biol. 119, pp. 1371-1380.
- Pennell, R.I., Knox, J.P., Scofield, G.N., Selvendran, R.R., Roberts, K., 1989. A family of abundant plasma membrane-associated glycoproteins related to the arabinogalactan proteins is unique to flowering plants. Journal of Cell Biology 108 (5) , pp. 1967-1977.
- Pettolino, F., Liao, M.L., Ying, Z., Mau, S.L., Bacic, A., 2006. Structure, function and cloning of arabinogalactan-proteins (AGPs) : an overview. Food and Food Ingredients J. Japan 221, pp. 12-25.
- Poon, S., Heath, R.L., Clarke, A.E., 2012. A chimeric arabinogalactan protein promotes somatic embryogenesis in cotton cell culture. Plant Physiol. 160 (2), pp. 684-695.
- Popper, Z.A., 2011. Extraction and detection of arabinogalactan proteins. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.) 715 , pp. 245-254.
- Portillo, L., Olmedilla, A., Santacruz-Ruvalcaba, T., 2012. Cellular and molecular changes associated with somatic embryogenesis induction in *Agave tequilana*. Protoplasma 249 (4), 1pp. 101-1107.

- Q -

- Qin, Y., Zhao J., 2006. Localization of arabinogalactan protein in egg cells, zygotes, and two-celled proembryos and effects of b-D-glucosyl Yariv reagent on egg cell fertilization and zygote division in *Nicotiana tabacum* L. Sex. Plant Reprod. 20, pp. 213-224.
- Qu, Y., Egelund J., Gilson, P.R., Houghton, F., Gleeson, P.A., Schultz, C.J., Bacic, A., 2008. Identification of a novel group of putative *Arabidopsis thaliana* b-(1,3)-galactosyltransferases. Plant Mol. Biol. 68, pp. 43-59.

- R -

- Renard, D., Lavenant-Gourgeon, L., Ralet, M.C., Sanchez, C., 2006. *Acacia senegal* gum : continuum of molecular species differing by their protein to sugar ratio, molecular weight, and charges. Biomacromolecules 7 (9), pp. 2637-49.
- Renard, D., Garnier, C., Lapp, A., Schmitt, C., Sanchez, C., 2012. Structure of arabinogalactan-protein from *Acacia* gum: From porous ellipsoids to supramolecular architectures. Carbohydr. Polymers 90 (1), pp. 322-332.
- Ringli C., Keller B., Ryser U., 2001. Glycine rich proteins as structural components of plant cell walls. Cell. Mol. Life Sci. 50 (10), 1430-1441.
- Rose, J.K., Bashir, S., Giovannoni, J.J., Jahn, M.M., Saravanan, R.S., 2004. Tackling the plant proteome : practical approaches, hurdles and experimental tools. Plant J. 39 (5), pp. 715-733.
- Royaert, S., Phillips-Mora, W., Leal, A.M.A., Cariaga, K., Brown, J.S., Kuhn, D.N., Schnell, R.J., Motamayor, J.C., 2011. Identification of marker-trait associations for self-compatibility in a segregating mapping population of *Theobroma cacao* L..Tree Genetics and Genomes 7 (6), pp. 1159-1168.
- Rumyantseva, N.I, 2005. Arabinogalactan proteins: Involvement in plant growth and morphogenesis. Biochemistry (Moscow) 70 (10), pp. 1073-1085
- Rusconi, M., Conti, A., 2010. *Theobroma cacao* L., the Food of the Gods: A scientific approach beyond myths and claims. Pharmacol. Res. 61 (1), pp. 5-13.

- S -

- Saare-Surminski, K., Preil, W., Knox, J.P., Lieberei, R., 2000. Saare-Surminski, K., Preil, W., Knox, J.P., Lieberei, R., 2000. Arabinogalactan proteins in embryogenic and non-embryogenic callus cultures of *Euphorbia pulcherrima*. *Physiol. Plant.* 108 (2), pp. 180-187.
- Šamaj, J., Read, N.D., Volkmann, D., Menzel, D. Baluska, F., 2005. The endocytic network in plants. *Trends Plant Sci.* 15, 425-433.
- Šamaj, J., Salaj, T., Matusova, R., Salj, J., Takac, T, Samjova, O., Volkmann, D., 2008. Arabinogalactan-protein epitope Gal4 is differentially regulated and localized in cell lines of hybrid fir (*Abies alba* x *Abies cephalonica*) with different embryogenic and regeneration potential. *Plant Cell Rep.* 27 (2), pp. 221-229.
- Samuels, G.J., Ismaiel, A., Rosmana, A., Junaid, M., Guest, D., McMahon, P., Keane, P., et al., 2012. Vascular Streak Dieback of cacao in Southeast Asia and Melanesia: *In planta* detection of the pathogen and a new taxonomy. *Fungal Biol.* 116 (1), pp. 11-23.
- Sanaravan, R.S., Rose, J.K., 2004. A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissue. *Proteomics* 4 (9), pp. 2522-2532.
- Santos, R.C., Pires, J.L., Correa, R.X., 2012. Morphological characterization of leaf, flower, fruit and seed traits among Brazilian *Theobroma* L. species. *Genetic Resources Crop Evol.* 59 (3), pp. 327-345.
- Sarmadi, B., Aminuddin, F., Hamid, M., Saari, N., Abdul-Hamid, A., Ismail, A., 2012. Hypoglycemic effects of cocoa (*Theobroma cacao* L.) autolysates. *Food Chem.* 134 (2), pp. 905-911.
- Sarmadi, B., Ismail, A., Hamid, M., 2011. Antioxidant and angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory activities of cocoa (*Theobroma cacao* L.) autolysates. *Food Res. Internat.* 44 (1), pp. 290-296.
- Schindler, T., Bergfeld, R., Schopfer, P., 1995. Arabinogalactan proteins in maize coleoptiles : developmental relationship. *Plant J.*, 7, pp. 25-36.

- Schlessinger, J., Lax, I., Lemmon, M., 1995. Regulation of growth factor activation by proteoglycans : what is the role of the low affinity receptors? *Plant Cell* 83, pp. 357-360.
- Schultz, C.J., Gilson, P., Oxley, D., Youl, J., Bacic, A., 1998. GPI-anchor an arabinogalactan-proteins : implication for signalling in plants. *Trends Plant Sci.* 3, pp. 426-431.
- Schultz, C.J., Ferguson, K.L., Lahnstein, J., Bacic, A., 2004. Post-translational modifications of arabinogalactan-peptides of *Arabidopsis thaliana* : endoplasmic reticulum and glycosylphosphatidylinositol-anchor signal cleavage sites and hydroxylation of proline. *J. Biol. Chem.* 279, pp. 45503-45511.
- Schultz, C.J., Johnson, K.L., Currie, G., Bacic, A., 2000. The classical arabinogalactan protein gene family of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12 (9), pp. 1751-1767
- Schultz, C.J., Rumsewicz, M.P., Johnson, K.L., Jones, B.J., Gaspar, Y.M., Bacic, A., 2002. Using genomic resources to guide research directions. The arabinogalactan protein gene family as a test case. *Plant Physiol.* 129 (4), pp. 1448-1463.
- Seifert, G.J., Roberts, K., 2007. The biology of arabinogalactan proteins. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58, pp. 137-161.
- Serpe, M.D., Nothnagel, E.A., 1994. Effect of Yariv phenylglycosides on *Rosa* cell suspensions : evidence for involvement of arabinogalactan-proteins in cell proliferation. *Planta* 193, pp. 542-550.
- Serpe, M.D., Nothnagel, E.A., 1996. Heterogeneity of arabinogalactan-proteins on the plasma membrane of rose cells. *Plant Physiol.* 112 (3), pp. 1261-1271.
- Showalter, A.M., 1993. Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell* 5, pp. 9-23.
- Showalter, A.M., 2001. Arabinogalactan-proteins: Structure, expression and function. *Cell. Mol. Life Sci.* 58 (10), pp. 1399-1417.
- Showalter, A.M., Keppler, B., Lichtenberg, J., Gu, D., Welch, L.R., 2010. A bioinformatic approach to the identification, classification, and analysis of hydroxyproline-rich glycoproteins. *Plant Physiol.* 153 (2), pp. 485-513.
- Simon, S., Païro, B., Villain, M., D'Abzac, P., Van Hullebusch, E., Lens, P., 2009. Evaluation of size exclusion chromatography (SEC) for the characterization of extracellular

- polymeric substances (EPS) in anaerobic granular sludges. *Bioresource Technol.* 100, 6258-6268.
- Smallwood, M., Yates, E.A., Willats, W.G.T., Martin, H., Knox, J.P., 1996. Immunochemical comparison of membrane-associated and secreted arabinogalactan-proteins in rice and carrot. *Planta* 198, pp. 452-459.
- Steinmacher, D.A., Saare-Surminski, K., Lieberei, R., 2012. Arabinogalactan proteins and the extracellular matrix surface network during peach palm somatic embryogenesis. *Physiol. Plant.* 146 (3) , pp. 336-349.
- Steffan, W., Kovac, P., Albersheim, P., Darvill, A.G., Hahn, M.G., 1995. Characterization of a monoclonal antibody that recognizes an arabinosylated (1-6)-beta-D-galactan epitope in plant complex carbohydrates. *Carbohydr. Res.* 275 (2), pp. 295-307.
- Strasser, R., Bondili, J.S., Schoberer, J., Svoboda, B., Liebinger, E., Glössl, J. Altmann, F., Steinkellner, H., Mach, L., 2007. Enzymatic properties and subcellular localization of *Arabidopsis* beta-N-acetylhexosaminidases. *Plant Physiol.* 145 (1), pp. 5-16.
- Sommer-Knudsen J., Lush W.M., Bacic A., Clarke A.E., 1998. Re-evaluation of the role of a transmitting tract-specific glycoprotein on pollen tube growth. *Plant J.* 13, 529-535.
- Somerville, C., 2006. Cellulose synthesis in higher plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22, pp. 53-78.
- Sousa Silva, C.R., Figueira, A., 2005. Phylogenetic analysis of *Theobroma* (Sterculiaceae) based on Kunitz-like trypsin inhibitor sequences. *Plant Systematics Evol.* 250 (1-2), pp. 93-104.
- Spicer, S.S., Schulte, B.A., 1992. Diversity of cell glycoconjugates shown histochemically: A perspective. *J. Histochem. Cytochem.* 40 (1), pp. 1-38.
- Sutherland, P.W., Hallet, I.C., MacRae, E., Fischer, M., Redgwell, R.J., 2004. Cytochemistry and immunolocalisation of polysaccharides and proteoglycans in the endosperm of green *Arabica* coffee beans. *Protoplasma* 223 (2-4), 203-211.
- Swanson, J.-D., Carlson, J.E., Gultinan, M.J., 2008. Comparative flower development in *Theobroma cacao* based on temporal morphological indicators. *Internat. J. Plant Sci.* 169 (9), pp. 1187-1199.

- T -

- Tan C.L., Furtek D.B., 2003. Development of an in vitro regeneration system for *Theobroma cacao* from mature tissues. *Plant Sci.* 164, pp. 407-412.
- Tan, L., Leykam, J.F., Kieliszewski, M.J., 2003. Glycosylation motifs that direct arabinogalactan-proteins. *Plant Physiol.* 123 (3), pp. 1362-1369.
- Tan, L., Showalter, A.M., Egelund, J., Hernandez-Sanchez A., Doblin, M.S., Bacic, A., 2012. Arabinogalactan-proteins and the research challenges for these enigmatic plant cell surface proteoglycans. *Front. Plant Sci.* 3 (140), pp. 1-10.
- Thevenin, J.-M., Rossi, V., Ducamp, M., Doare, F., Condina, V., Lachenaud, P., 2012. Numerous clones resistant to *Phytophthora palmivora* in the "Guiana" genetic group of *Theobroma cacao* L.. *PLoS ONE* 7 (7), e40915.
- Thiele, K., Wanner, G., Kindzierski, V., Jürgens, G., Mayer, U., Pach, F., Assaad, F.F., 2009. The timely deposition of callose is essential for cytokinesis in *Arabidopsis*. *Plant J.* 58 (1), pp. 13-26.
- Thompson, J.E., Fry, S.C., 2000. Evidence for covalent linkage between xyloglucan and acidic pectins in suspension-cultured rose cells. *Planta* 211, pp. 275-286.
- Tobisawa, Y., Imai, Y., Fukuda, M., Kawashima, H., 2010. Sulfation of colonic mucins by N-acetylglucosamine 6-O-sulfotransferase-2 and its protective function in experimental colitis in mice. *J. Biol. Chem.* 285 (9), pp. 6750-6760.
- Tonietto A., Sato J.H., Teizeira J.B., de Souza E.M., Pedrosa F.O., Franco O.L., Mehta A., 2012. Proteomic analysis of developing somatic embryos of *Coffea arabica*. *Plant Mol. Biol. Rep.* 30(6), 1393-1399.
- Toonen, M.A.J.L., Schmiidt, E.D.L., van Kammen, A. de Vries, S.C., 1997. Promotive and inhibitory effects of diverse arabinogalactan proteins on *Daucus carota* L. somatic embryogenesis. *Planta* 203, pp. 188-195.
- Traoré, A., Maximova, S.N., Gultinan, M.J., 2003. Micropropagation of *Theobroma Cacao* L. using somatic embryo-derived plants. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 39, pp. 332-337.
- Traoré, A., Gultinan, M.J., 2006. Effects of carbon source and explants type on somatic embryogenesis of four cacao genotypes. *HortSci.* 41 (3), pp. 753-758.

- V -

- Van Hengel, A.J., Tadesse, Z., Immerzeel, P., Schols, H., van Kammen, A., de Vries, S.C., 2001. N-acetylglucosamine and glucosamine-containing arabinogalactan proteins control somatic embryogenesis. *Plant Physiol.* 125, pp. 1880-1890.
- Van Hengel A.J., Roberts, K., 2002. Fucosylated arabinogalactan-proteins are required for full root cell elongation in *Arabidopsis*. *Plant J.* 32, pp. 105-113.
- Van Hengel, A.J., Van Kammen, A., De Vries, S.C., 2002. A relationship between seed development, Arabinogalactan-proteins (AGPs) and the AGP mediated promotion of somatic embryogenesis. *Physiol. Plant.* 114 (4), pp. 637-644.
- Van Hengel, A.J., Roberts, K., 2003. AtAGP30, an arabinogalactan-protein in the cell walls of the primary root, plays a role in root regeneration and seed germination. *Plant J.* 36, pp. 256-270.
- Van Engelen, F.A., de Vries, S.C., 1992. Extracellular proteins in plant embryogenesis. *Trends Genet.* 8 (2), pp. 66-70.
- Van Hall C.J.J., 1914. *Cocoa*. Macmillan: London.
- Van holst, G.J., Klis, F.M., Dewilt, P.J.M., Hazenberg, C.A.M., Buijs, J., Stegwee D., 1981. Arabinogalactan-protein from a crude cell organelle fraction of *Phaseolus vulgaris* L.. *Plant Physiol.* 68, pp. 910-913.
- Vinogradova, I.S., Falaleev, O.V., 2012. Formation of the vascular system of developing bean (*Phaseolus limensis* L.) seeds according to nuclear magnetic resonance microtomography. *Russian J. Develop. Biol.* 43 (1), pp. 25-34.
- Vissenberg, K., Martinez-Vilchez, I.M., Verbelen, J.P., Miller, J.G., Fry, S.C., 2000. *In vivo* colocalization of xyloglucan endotransglycosylase activity and its donor substrate in the elongation zone of *Arabidopsis* roots. *Plant Cell* 12 (7), pp. 1229-1237.

- W -

- Whitlock, B.A., Bayer, C., Baum, D.A., 2001. Phylogenetic relationships and floral evolution of the Byttnerioideae ("Sterculiaceae" or Malvaceae s.l.) based on sequences of the chloroplast gene, *ndhF*. *Systematic Bot.* 26 (2), pp. 420-437.

- Wielgoss, A., Clough, Y., Fiala, B., Rumedé, A., Tschardtke, T., 2012. A minor pest reduces yield losses by a major pest: Plant-mediated herbivore interactions in Indonesian cacao. *J. Applied Ecol.* 49 (2), pp. 465-473.
- Willats, W.G., Steele-King, C.G., Marcus, S.E., Knox, J.P., 1999. Side chains of pectic polysaccharides are regulated in relation to cell proliferation and cell differentiation. *Plant J.* 20 (66), pp. 619-628.
- Windels, D., 2005. Etude de l'implication des arabinogalactane protéines (AGPs) au cours de l'embryogenèse somatique chez différents géotypes de chicorée. Thèse d'Université, Lille, 154p.
- Wood, G.A.R., Lass, R.A., 1985. Cacao. Logmar scientific and technical, England, 620p.
- Wu, Y., Williams, M., Bernard, S., Driouich, A., Showalter, A.M., Faik, A., 2010. Functional identification of two non redundant *Arabidopsis* $\alpha(1,2)$ fucosyltransferases specific to arabinogalactan proteins. *J. Biol. Chem.* 285 (18), pp. 13638-13645.

- X -

- Xu, J., Tan, L., Lamport, D.T.A., Showalter, A.M., Kieliszewski, M.J., 2008. The O-Hyp glycosylation code in tobacco and *Arabidopsis* and a proposed role of Hyp-glycans in secretion. *Phytochemistry* 69, pp. 1631-1640.

- Y -

- Yang, J., Zhang, Y., Liang, Y., Showalter, A.M., 2011. Expression analyses of AtAGP17 and AtAGP19, two lysine-rich arabinogalactan proteins, in *Arabidopsis*. *Plant Biol.* 13 (3), pp. 431-438.
- Yariv, J., Rapport M.M., Graf, L., 1962. The interaction of glycosides and saccharides with antibody to the corresponding phenylazo glycosides. *Biochemistry J.* 85, pp., 383-388.
- Yates, E.A., Valdor, J.F., Haslam, S.M., Morris, H.R., Dell, A., Mackie, W., Knox, J.P., 1996. Characterization of carbohydrate structural features recognized by anti-arabinogalactan protein monoclonal antibodies. *Glycobiology*, 6, pp. 131-139.

Yu, M., Zhao, J., 2012. The cytological changes of tobacco zygote and proembryo cells induced by beta-glucosyl Yariv reagent suggest the involvement of arabinogalactan proteins in cell division and cell plate formation. *BMC Plant Biol.* 1 (12) pp. 126-142.

- Z -

Zhang, Y., Yang, J., Showalter, A.M., 2011. AtAGP18, a lysine-rich arabinogalactan protein in *Arabidopsis thaliana*, functions in plant growth and development as a putative co-receptor for signal transduction. *Plant Signaling, Behavior* 6 (6), pp. 855-8.

Zhong, J., Ren, Y.J., YU, M., Ma, T.F., Zhao, J., 2011. Roles of arabinogalactan proteins in cotyledon formation and cell wall deposition during embryo development of *Arabidopsis*. *Protoplasma* 248, pp. 551-563.

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

ANNEXES

ANNEXE 1 Composition du milieu de culture DKW (Driver et Kuniyuki, 1984)

	PCG	SCG 1	SCG 2	ED
Macroéléments :				
NH ₄ NO ₃	1,416 g.L ⁻¹	1,416 g.L ⁻¹	1,416 g.L ⁻¹	1,416 g.L ⁻¹
Ca(NO ₃) ₂ , 4H ₂ O	1,969 g.L ⁻¹	1,968 g.L ⁻¹	1,968 g.L ⁻¹	1,968 g.L ⁻¹
CaCl ₂ , 2H ₂ O	0,149 g.L ⁻¹	0,0149 g.L ⁻¹	0,0149 g.L ⁻¹	0,0149 g.L ⁻¹
K ₂ SO ₄	1,559 g.L ⁻¹	0,1559 g.L ⁻¹	0,1559 g.L ⁻¹	0,1559 g.L ⁻¹
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,74 g.L ⁻¹	0,074 g.L ⁻¹	0,074 g.L ⁻¹	0,074 g.L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	0,265 g.L ⁻¹	0,0265 g.L ⁻¹	0,0265 g.L ⁻¹	0,0265 g.L ⁻¹
Microéléments :				
ZnSO ₄ , 6H ₂ O	17 mg.L ⁻¹	17 mg.L ⁻¹	17 mg.L ⁻¹	17 mg.L ⁻¹
MnSO ₄ , H ₂ O	33,4 mg.L ⁻¹	33,4 mg.L ⁻¹	33,4 mg.L ⁻¹	33,4 mg.L ⁻¹
FeSO ₄ , 7H ₂ O	33,8 mg.L ⁻¹	33,8 mg.L ⁻¹	33,8 mg.L ⁻¹	33,8 mg.L ⁻¹
Na ₂ , EDTA	45,4 mg.L ⁻¹	45,4 mg.L ⁻¹	45,4 mg.L ⁻¹	45,4 mg.L ⁻¹
H ₃ BO ₃	4,8 mg.L ⁻¹	4,8 mg.L ⁻¹	4,8 mg.L ⁻¹	4,8 mg.L ⁻¹
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,25 mg.L ⁻¹	0,25 mg.L ⁻¹	0,25 mg.L ⁻¹	0,25 mg.L ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	0,39 mg.L ⁻¹	0,39 mg.L ⁻¹	0,39 mg.L ⁻¹	0,39 mg.L ⁻¹
Vitamines :				
Thiamine-HCl	2 mg.L ⁻¹	0,2 mg.L ⁻¹	0,5 mg.L ⁻¹	
Acide nicotinique	1 mg.L ⁻¹	0,1 mg.L ⁻¹	0,05 mg.L ⁻¹	
Glycine	2 mg.L ⁻¹	0,2 mg.L ⁻¹	-----	
Pyridoxine	-----	-----	0,05 mg.L ⁻¹	
Glutamine	250 mg.L ⁻¹			

	PCG	SCG 1	SCG 2	ED
Myoinositol	200 mg.L ⁻¹	100 mg.L ⁻¹	100 mg.L ⁻¹	100 mg.L ⁻¹
Hormones Acide 2,4 dichlorophenoxyacétique (2,4 D) Thidiazuron (TDZ) Kinétine (BA) 6-benzylaminopurine	2 mg.L ⁻¹ 5 µg.L ⁻¹ ----- -----	2 mg.L ⁻¹ ----- 50 mg.L ⁻¹ -----	2 mg.L ⁻¹ ----- ----- 50 mg.L ⁻¹	
Glucose	20 g.L ⁻¹	20 g.L ⁻¹	20 g.L ⁻¹	1 g.L ⁻¹
Saccharose				30 g.L ⁻¹
Gelrite	2,4 g.L ⁻¹	2,4 g.L ⁻¹	2,4 g.L ⁻¹	2,4 g.L ⁻¹
pH	5,8	5,7	5,7	5,7

Résumé

Trois génotypes de cacaoyer, choisis en fonction de leur degré d'embryogénie ont été utilisés pour rechercher l'implication des arabinogalactanes protéines (AGPs) au cours de l'embryogenèse de *Theobroma cacao* L.. Les critères morphologiques histologiques et biochimiques ont permis de caractériser les stades de développement permettant une analyse comparative de l'embryogenèse somatique et l'embryogenèse zygotique. Les protéines glycosylées présentaient une expression différentielle en fonction des stades de développement et des génotypes. Les AGPs ont été mis en évidence pour la première fois chez le cacaoyer à l'aide du β -D-glucosyl Yariv et des anticorps spécifiques anti AGPs sans que l'on ne puisse observer aucune différence au regard des stades de développement ou du génotype. Les AGPs des embryons de cacaoyer, isolées à l'aide du β -D-glucosyl Yariv ont été purifiées suivant leur polarité et leur masse moléculaire. Elles sont en majorité très glycosylées et présentent une composition en monosaccharides similaire dans les embryons somatiques et zygotiques, mais qui diffère de celle du milieu de culture. La séparation par le CES calibrée par les protéines a permis de définir les masses moléculaires apparentes. Trois fractions ont été détectées, de 7 kDa à 180 kDa ; 180 à 670 kDa et supérieure à 670 kDa. L'association de la détection UV à 215 nm et la fluorescence des protéines à 221/350 nm : Ex/Em permet de détecter facilement l'hétérogénéité des fractions des AGPs et de suivre l'évolution des AGPs au cours du développement des embryons. La fraction éluée entre 9 et 11 ml a été identifiée comme celle qui serait la plus impliquée dans l'embryogenèse chez le cacaoyer.

Mots clés: Arabinogalactan protéines, embryogenèse, *Theobroma cacao* L., chromatographie, fluorescence, électrophorèse.

Abstract

Three genotypes of *Theobroma cacao* L., selected according to their degree of embryogenesis were used to investigate the involvement of arabinogalactan proteins (AGPs) during embryogenesis. Morphological, histological and biochemical criteria were used to identify developmental stages for a comparative analysis of somatic and zygotic embryogenesis. Glycosylated proteins showed differential expression according to developmental stages and genotype. The AGPs were highlighted for the first time in cocoa with the β -D-glucosyl Yariv reagent and specific antibodies against AGPs without developmental stages or genotype effect. The AGPs isolated from cocoa embryos using β -D-glucosyl Yariv reagent, were purified according to their polarity and molecular weight. They are mostly glycosylated. The monosaccharide composition is different in somatic and zygotic embryos from the culture medium. Separation by SEC after proteins calibration of the column allowed us to define the apparent molecular weight of cocoa AGPs. Three fractions were detected, from 7 kDa to 180 kDa; 180-670 kDa and greater than 670 kDa. The combination of UV detection at 215 nm and proteins fluorescence at Ex/Em: 221/350 nm can detect the diversity of AGPs and has been used to monitor AGPs during embryos development. The fraction eluted between 9 and 11 ml has been identified as being heavily involved in the embryogenesis of cocoa tree.

Key words: Arabinogalactan proteins, embryogenesis, *Theobroma cacao* L., chromatography, fluorescence, electrophoresis.