

Université de Montréal

**Rôle de la protéine ScFRK1 dans le développement du
sac embryonnaire et son impact sur le guidage des tubes
polliniques**

par

Edith Lafleur

Département de Sciences Biologiques
Faculté des Arts et Sciences

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M. Sc.)
en sciences biologiques

Décembre, 2009

© Edith Lafleur, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Rôle de la protéine ScFRK1 dans le développement du
sac embryonnaire et son impact sur le guidage des tubes
polliniques**

présenté par :

Edith Lafleur

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Mario Cappadocia, président-rapporteur

Dr. Daniel P. Matton, directeur de recherche

Dr. Jean Rivoal, co-directeur

Dr. Jean-Philippe Vielle-Calzada, membre du jury

Résumé

Le gène *Solanum chacoense* Fertilization-Related Kinase 1 (*ScFRK1*) code pour une protéine de la famille des MAPKK kinases exprimée spécifiquement dans les ovules. Son transcrit s'accumule principalement dans la zone micropylaire du sac embryonnaire à l'anthèse et diminue rapidement après pollinisation. Ces résultats suggèrent un rôle possible avant ou pendant la fécondation. Bien qu'aucune expression ne soit détectée dans le pollen à maturité, la protéine est cependant présente dans les cellules mères de microspores. Des plantes transgéniques sous-exprimant *ScFRK1* ne montrent aucun phénotype au niveau des tissus végétatifs, mais présentent de petits fruits dépourvus de graines. L'étude microscopique du gamétophyte femelle révèle que son développement ne progresse pas au-delà du stade de la mégaspore fonctionnelle et une grande proportion de sacs embryonnaires anormaux est corrélée avec une faible expression de *ScFRK1*. De plus, la production de pollen viable diminue en fonction de la baisse des niveaux d'expression du gène, ce qui pourrait s'expliquer par un problème au cours de la mitose I. Puisque l'intégrité du sac embryonnaire est essentielle au guidage des tubes polliniques, nous avons conçu un système de guidage semi-*in vivo* permettant d'évaluer la capacité des ovules du mutant *ScFRK1* à les attirer. L'attraction est sévèrement affectée dans de telles conditions, ce qui confirme l'implication des cellules de la zone micropylaire comme source attractive. Notre système nous a également permis de démontrer que le guidage est très spécifique à l'espèce et que cette attraction constitue un mécanisme important favorisant la spéciation et la maintenance des barrières interspécifiques dans la reproduction sexuée des végétaux.

Mots-clés : sac embryonnaire, cellules micropylaires, mégagamétogenèse, guidage des tubes polliniques, *Solanum chacoense*, Solanacées, MAPKKK.

Abstract

The *Solanum chacoense* Fertilization-Related Kinase 1 (*ScFRK1*) is a member of plant MAPKKK that is specifically expressed in ovules. *ScFRK1* mRNA levels accumulate predominantly in the egg apparatus cells of the embryo sac at mature stage and decrease rapidly following pollination. These results suggest both pre- and post-fertilization roles in ovule development. Although no expression could be detected in mature pollen, *FRK1* mRNAs could be detected in pollen mother cells. Transgenic plants expressing sense or antisense *ScFRK1* showed no abnormal phenotype in vegetative tissues but produced seedless fruits upon pollination. A microscope-based examination of developing female gametophytes revealed that its formation did not progress further than the functional megaspore stage in affected transgenic plants and, as the levels of *ScFRK1* mRNA decreased, the percentage of normal embryo sacs declined. Surprisingly, even in severely affected plants producing no or very few embryo sacs, pollination led to the production of parthenocarpic fruits. Similarly, viable pollen production declined with decreasing levels of *ScFRK1* and this could be linked to affected mitosis I. Since embryo sac integrity is a prerequisite for pollen tube guidance, we devised a semi-*in vivo* pollen tube growth system to assess the ability of the *ScFRK1* mutant ovules to attract pollen tubes. As expected, guidance was severely affected, confirming the involvement of the egg apparatus cells as the source of attracting molecules. Attraction was also determined to be highly species-specific and developmentally-regulated with the acquisition of attraction competence on anthesis day.

Keywords : embryo sac, egg apparatus, megagametogenesis, pollen tube guidance, *Solanum chacoense*, Solanaceae, MAPKKK.

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	x
Liste des sigles et abréviations.....	xii
Remerciements.....	xvii
1. Introduction.....	19
1.1 Le développement du sac embryonnaire.....	19
1.2 Le développement des grains de pollen.....	23
1.3 La double fécondation et la formation des fruits.....	25
1.4 L'attraction des tubes polliniques.....	28
1.4.1 La phase sporophytique.....	28
1.4.2 La phase funiculaire.....	30
1.4.3 La phase micropylaire.....	30
1.4.4 La fusion des gamètes.....	32
1.5 Incompatibilité génétique.....	34
1.6 Historique de <i>Solanum chacoense</i>	35
1.7 Modules de signalisation impliqués dans la reproduction : MAPK et RLK.....	36
1.8 Présentation du projet de recherche et les résultats antérieurs.....	39
2. Matériel et Méthodes.....	43
2.1 Matériel végétal.....	43
2.2 Création d'hybrides par croisement.....	43
2.3 Observations en contraste interférentiel différentiel (DIC).....	44
2.4 Observations de la viabilité des grains de pollen et de la microsporogénèse.....	45
2.5 Guidage des tubes polliniques.....	45
2.5.1 Système de croissance semi- <i>in vivo</i>	45

2.5.2 Statistiques	48
2.6 Observations de la croissance des tubes polliniques.....	49
2.7 Analyse de type Northern.....	50
2.7.1 Récolte des tissus	50
2.7.2 Extraction d'ARN	50
2.7.3 Migration et transfert sur membrane.....	50
2.7.4 Préparation de la sonde	51
2.7.5 Préhybridation, hybridation et lavages.....	51
2.7.6 Exposition de la membrane.....	52
2.8 Analyse de type Southern - « Garden blot ».....	52
2.8.1 Récolte des tissus	52
2.8.2 Extraction d'ADN génomique	52
2.8.3 Migration et transfert sur membrane.....	53
2.8.4 Préparation de la sonde, hybridation et exposition de la membrane.....	53
2.9 Analyses phylogénétiques.....	53
2.9.1 Amplification PCR.....	53
2.9.2 Séquençage.....	54
2.10 Construction de transgènes	55
2.11 Production de plantes transgéniques.....	57
2.11.1 Transformation de la bactérie <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	57
2.11.2 Préparation des tissus foliaires et induction avec la bactérie transformée	57
2.11.3 Traitement des tissus foliaires.....	58
2.12 Analyse des plantes transgéniques.....	58
2.12.1 Plantes transgéniques pour l'analyse de délétions de promoteur : révélation de l'activité enzymatique GUS	58
2.12.2 Transgéniques de complémentation de promoteur	59
3. Résultats	61
3.1 Expression spatio-temporelle de <i>ScFRK1</i>	61

3.2	Caractérisation phénotypique des lignées mutantes <i>Scfrkl</i>	62
3.2.1	Observations macroscopiques	62
3.2.1.1	Observations des organes femelles et des fruits	61
3.2.1.2	Observations des anthères et de la morphologie des grains de pollen	65
3.2.2	Observations microscopiques	68
3.2.2.1	Observations des grains de pollen	68
3.2.2.2	Microscopie en contraste interférentiel différentiel (DIC)	69
3.3	Guidage des tubes polliniques	73
3.3.1	Le guidage est-il affecté chez le mutant <i>Scfrkl S1</i> ?	75
3.3.2	La pollinisation et la fécondation affectent-elles le guidage?	76
3.3.3	Acquisition de la compétence d'attraction	77
3.3.4	Spécificité du signal d'attraction	78
3.3.4.1	Sélection d'espèces apparentées à <i>S. chacoense</i> - «Garden blot »	78
3.3.4.2	Analyses phylogénétiques	80
3.3.4.3	Guidage des tubes polliniques selon les espèces testées	82
3.3.5	Nature protéique du ligand	83
3.4	Croisements entre différentes espèces de <i>Solanum</i>	86
3.5	Isolement du promoteur <i>ScFRK1</i>	92
4.	Discussion	98
4.1	Expression spatio-temporelle de <i>ScFRK1</i>	98
4.2	Phénotype	99
4.2.1	Observations des organes femelles et des fruits	99
4.2.2	Observations des grains de pollen	103
4.3	Analyse phylogénétique	103
4.3.1	« Garden blot »	103
4.3.2	Phylogénie	105
4.4	Guidage des tubes polliniques	107
4.5	Croisements entre différentes espèces de <i>Solanum</i>	113

4.6 Isolement du promoteur	117
5. Conclusion et perspectives	119
Bibliographie.....	I
Annexe 1	XI
Annexe 2	XII
Annexe 3	XIII

Liste des tableaux

Tableau I : Corrélation entre la longueur du bourgeon floral et le stade de développement du gamétophyte femelle chez <i>S. chacoense</i>	65
Tableau II : Pourcentage de sacs embryonnaires (SE) normaux vs anormaux dans les différentes lignées de plantes transgéniques <i>Sfrk1</i> à l'anthèse.....	71
Tableau III : Guidage des tubes polliniques en présence d'ovules des lignées <i>Scfrk1</i> S1 et SP10.....	75
Tableau IV : Guidage des tubes polliniques lors des essais d'inductibilité.....	77
Tableau V : Guidage des tubes polliniques lors des essais sur les stades de développement.....	78
Tableau VI : Guidage des tubes polliniques lors des essais avec les différentes espèces de <i>Solanum</i>	83
Tableau VII : Guidage des tubes polliniques lors des essais portant sur la nature protéique du ligand.....	84
Tableau VIII : Tableau récapitulatif des différents croisements intraspécifiques et interspécifiques.....	90

Liste des figures

Figure 1: Représentation schématique du développement d'un sac embryonnaire de type <i>Polygonum</i>	22
Figure 2 : Représentation schématique de la microsporogénèse chez la plupart des angiospermes.....	24
Figure 3 : Représentation schématique temporelle des stades d'interaction entre les grains de pollen de <i>S. chacoense</i> et les différents tissus récepteurs femelles.....	26
Figure 4 : Analyse de séquence de <i>ScFRK1</i>	42
Figure 5 : Système semi- <i>in vivo</i>	47
Figure 6 : Expression spatio-temporelle de <i>ScFRK1</i>	63
Figure 7 : Analyses phénotypiques des fruits des lignées transgéniques.....	64
Figure 8 : Viabilité des grains de pollen chez <i>S. chacoense</i>	67
Figure 9 : Viabilité des grains de pollen chez <i>S. chacoense</i> à différents stades de développement par des colorations à l'orcéine et au Lugol.....	70
Figure 10 : Développement du gamétophyte femelle chez <i>S. chacoense</i> au cours de la mégasporogénèse et de la mégagamétogénèse.....	72
Figure 11 : Représentation schématique du système semi- <i>in vivo</i> en présence d'un seul type d'ovules ou d'ovules mis en compétition.....	74
Figure 12 : Détection du gène <i>ScFRK1</i> par « Garden blot ».....	79
Figure 13 : Arbre phylogénétique des séquences ITS au sein de quelques espèces de Solanacées.....	81
Figure 14 : Guidage des tubes polliniques dans un système semi <i>in vivo</i> en présence d'ovules positionnés à ~0,7 mm de l'extrémité du style ScG4.....	85
Figure 15 : Analyses phénotypiques de croissance et de développement des fruits matures des croisements entre les différentes espèces de <i>Solanum</i> (S1 à S12) et le contrôle ScV22 30 jours AP.....	89

Figure 16 : Croisements interspécifiques.....	91
Figure 17 : Alignement des séquences protéiques de <i>ScFRK1</i> provenant des géotypes Sc582 et ScG4.....	94
Figure 18 : Schématisation des constructions de complémentation et de délétion du promoteur <i>ScFRK1</i>	95
Figure 19 : Séquence de <i>ScFRK1</i> comprenant la section promotrice.....	96
Figure 20 : Analyses de croissance et de développement des fruits matures provenant des croisements entre les différentes constructions de complémentation du promoteur <i>ScFRK1</i> et le contrôle ScV22 30 jours après pollinisation.....	97
Figure 21 : <i>Solanum lycopersicum</i> (<i>Lycopersicon esculentum</i>) var. <i>Ailsa Craig</i>	XIII
Figure 22 : <i>Solanum bulbocastanum</i>	XIV
Figure 23 : <i>Solanum chacoense</i>	XV
Figure 24 : <i>Solanum commersonii</i> subsp. <i>commersonii</i>	XVI
Figure 25 : <i>Solanum microdontum</i>	XVII
Figure 26 : <i>Solanum pinnatisectum</i>	XVIII
Figure 27 : <i>Solanum tarijense</i>	XIX
Figure 28 : <i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>andigenum</i>	XX

Liste des sigles et abréviations

aa	acides aminés
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADNg	Acide désoxyribonucléique génomique
AGPs	arabinogalactan proteins
<i>AGP18</i>	<i>arabinogalactan protein 18</i>
AP	après pollinisation
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNr	ARN ribosomal
ATP	Adénosine triphosphate
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Bovine serum albumen
CaCl ₂	Chlorure de calcium
CCG	Central Cell Guidance
CI	indice de congruence (consistency index)
cm	centimètre
CTAB	Bromure d'hexadécyltriméthylammonium
C-terminal(e)	Domaine carboxyl terminal protéique
DIC	Differential interference contrast microscopy
DMSO	Dimethylsulfoxyde
dNTPs	Désoxynucléotides tri-phosphate
EcoRI	Endonucléase d' <i>Escherichia coli</i> RY13
EcoRV	Endonucléase d' <i>Escherichia coli</i> B946
EDTA	Ethylenedinitrilotetraacetic acid
EST	Expressed Sequence Tag
5' ETS	5' External Transcribed Spacer
FAA	Formaldéhyde; Acide acétique; Alcool (éthanol)
FER	FERONIA
Fig.	figure
g	gramme
GA	gibbérelline
GABA	acide g-aminobutyrique
<i>gaf2</i>	<i>gametophytic factor2</i>
GAP	Glucosylphosphatidylinositol-anchored protein
GEX3	Gamete-expressed 3
GFP	Green Fluorescent Protein
GUS	gène glucoronidase

h	heure
H ₃ BO ₃	Boric acid
HAP	heure(s) après pollinisation
HCl	Hydrochloric acid
H ₂ O	eau
<i>ino</i>	<i>inner-no-outer</i>
IRBV	Institut de Recherche en Biologie Végétale
ITS	Internal Transcribed Spacer
J	joules
kb	kilobase
kDa	kiloDalton
K ₃ PO ₄	Potassium phosphate
L	litre
LAT52	Late Anther Tomato 52
LBA-4404	souche d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
LeCTR2	<i>Lycopersicon esculentum</i> constitutive triple response
LePRK	<i>Lycopersicon esculentum</i> receptor-like kinase
<i>lis</i>	<i>lachesis</i>
<i>lre</i>	<i>LORELEI</i>
<i>maa</i>	<i>magatama</i>
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MAP2K	Mitogen activated protein kinase kinase
MAP3K	Mitogen activated protein kinase kinase kinase
MAP4K	Mitogen activated protein kinase kinase kinase kinase
MeJa	Méthyl-jasmonate
min	minute(s)
mg	milligramme
MgCl ₂	Chlorure de magnésium
ml	millilitre
mM	millimolaire
MPK3, 6	Mitogen-activated Protein Kinase 3, 6
N	normalité
NaCl	Chlorure de sodium
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
NaOH	Hydroxyde de sodium
ng	nanogramme
nm	nanomètre
NO	Oxyde nitrique
NtMEK2	<i>Nicotiana tabacum</i> MAPK/extracellular signal-regulated kinase
MOPS	3-(N-Morpholino) propanesulfonic acid
MS	Murashig et Skoog
NCBI	National Center for Biological Information

P	probabilité
<i>pat</i>	<i>parthenocarpic fruit</i>
pb	paire de bases
PCR	polymerase chain reaction
pH	potentiel hydrogène
<i>POP2</i>	<i>Pollen Pistil Interaction 2</i>
PRK1	Pollination-repressed kinase 1
RFLP	restriction fragment length polymorphism
RI	indice de rétention
RLK	Receptor-like kinase
RPK2	Receptor-like protein kinase 2
S ₁₁	Haplotype 11
S ₁₂	Haplotype 12
S ₁₃	Haplotype 13
S ₁₄	Haplotype 14
Sc	<i>Solanum chacoense</i>
Sc1022-1	génotype de <i>S. chacoense</i> avec les allèles d'incompatibilité S ₁₁ S ₁₃
Sc582	génotype de <i>S. chacoense</i> avec les allèles d'incompatibilité S ₁₃ S ₁₄
<i>ScFRK1</i>	<i>Solanum chacoense</i> Fertilization-related kinase 1
<i>Scfrk1</i> S1	<i>Solanum chacoense</i> Fertilization-related kinase 1 Sens 1
<i>Scfrk1</i> S27	<i>Solanum chacoense</i> Fertilization-related kinase 1 Sens 27
<i>Scfrk1</i> AS13	<i>Solanum chacoense</i> Fertilization-related kinase 1 Antisens 13
<i>ScFRK3</i>	<i>Solanum chacoense</i> Fertilization-related kinase 3
ScG4	génotype de <i>S. chacoense</i> avec les allèles d'incompatibilité S ₁₂ S ₁₄
ScV22	génotype de <i>S. chacoense</i> avec les allèles d'incompatibilité S ₁₁ S ₁₃
SDS	Sodium dodecyl sulphate
sec	seconde(s)
SEM	Scanning Electron Microscopy
SP10	« Self bud Pollination » de Sc582 avec les allèles d'incompatibilité S ₁₃ S ₁₃
S-RNases	Ribonucléase locus S
SRK	S-locus receptor kinase
SSC	Sodium saline citrate
TAE	tampon Tris-acetate-EDTA
TEM	Transmission Electron Microscopy
TTS	transmitting tissue specific
USA	United States of America
USDA	Unites States Department of Agriculture
UV	ultraviolet
V	volt
vs	versus
X	unité de concentration d'une solution

X-Gluc	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glucuronic acid, cyclohexylammonium salt
YEP	Yeast extracts peptone media
ZmEA1	gène <i>Zea mays EGG APPARATUS 1</i>
α - ³² P AT	α désoxyadénosine tri-phosphate
18S	ARN ribosomal 18S
°C	degré Celcius
2n	diploïde
3'	extrémité 3' hydroxyl
5'	extrémité 5' phosphate
μ g	microgramme
μ l	microlitre
μ m	micromètre
μ M	micromolaire
%	pourcentage
~	environ
χ^2	test statistique de khi carré
>	plus grand que

Dédicace

À tous ceux qui m'ont malheureusement quittés, ceux qui vivent à mes côtés et ceux qui s'ajouteront dans les années à venir.

Remerciements

En fait, qu'est-ce qu'exactly une maîtrise? C'est évidemment beaucoup de travail et un défi en perspective, mais c'est aussi un monde de découvertes tant sur le plan scientifique que sur soi-même. En effet, un moment de réflexion m'a permis de comprendre que j'avais finalement fait le bon choix.

Les premières personnes que j'aimerais profondément remercier sont toutes celles qui m'ont accompagné au cours de mes nombreuses années d'études. Les moments difficiles ont trouvé leurs sens grâce à vous. Je ne nommerai pas toutes ces personnes, plusieurs sauront se reconnaître à travers mes rires, mes pleurs inexpliqués, mes angoisses multiples ou mes idées saugrenues. Un clin d'œil tout spécial à ma chère famille, dont ma mère et ses petits mots réconfortants, mon père et son intérêt grandissant pour les sciences, ma soeur pour sa complicité et mes grands-parents pour la fierté qu'ils ont à mon égard. Merci à mon compagnon de vie, Jimmy, avec qui je partage tant de joie, d'expériences et maintenant une petite famille. Tu as toujours cru en moi et fait en sorte que mes rêves se réalisent.

Je voudrais remercier profondément Daniel P. Matton, mon directeur de recherche, qui m'a proposé un sujet de maîtrise aussi intéressant, mais surtout plus que complet. Merci pour ton aide, ton support et la confiance que tu m'as manifesté à maintes reprises, autant dans le choix de mes congrès, la chance inoubliable que j'ai eu d'effectuer un stage au Mexique et mon opportunité d'enseigner la biologie. Tu m'as grandement épaulé dans la recherche de bourses, dont celle du conseil de recherche en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) que je remercie chaleureusement.

Merci également à mes collègues de laboratoire, dont Eric pour ton amitié précieuse et ta joie de vivre, Hugo pour tes conseils de grand frère, Faiza pour le partage de nos joies

et petites misères de grossesse et Josée pour ta bonne humeur contagieuse. Un merci spécial aux stagiaires que j'ai formés et qui m'ont grandement aidés par la suite, Audrey Loubert-Hudon, Caroline Daigle et Théo Stafford-Richard. Je ne dois pas oublier tous les étudiants, professeurs et membres de l'Institut que j'ai eu la chance de côtoyer. Vous avez été ma deuxième famille et s'est pourquoi j'ai eu tant de plaisir à m'impliquer pour vous sur divers comités. Merci à tout le laboratoire Bruneau/Brouillet, dont Carole et Mariannick, les reines du PCR et de la systématique, pour votre aide et votre complicité durant l'élaboration des multiples activités IRBViennes.

Un remerciement particulier à Geneviève Laublin et Gabriel Théodorescu pour les soins et l'entretien minutieux qu'ils ont prodigué à mes plantes. Je tiens aussi à souligner l'aide de Charles Bertrand pour la microscopie électronique à balayage et à transmission, le soutien de Stéphane Daigle pour les statistiques ainsi que les conseils pratiques de Mario Cappadocia tout au long de ma maîtrise.

Finalement, merci à mon petit cœur Cédric pour les premiers coups de pied fugaces que j'ai ressentis durant la rédaction de ce mémoire. Maintenant, j'ai le bonheur de partager tes sourires et tes découvertes quotidiennes. Ma vie ne sera plus jamais la même avec ta venue tant désirée!

1. Introduction

Au cours de l'évolution, les plantes à fleurs, ou angiospermes, ont développé de nombreuses stratégies afin d'assurer leur survie, leur dispersion et leur colonisation aux quatre coins de la planète. Par l'intermédiaire de structures associées à la reproduction asexuée, les plantes ont la possibilité de créer de nombreux individus génétiquement identiques. En revanche, l'apparition de la fleur contenant les différents organes reproducteurs leur assure non seulement leur descendance, mais également l'évolution de leur espèce. En effet, la reproduction sexuée implique la formation et la fusion de gamètes, ce qui explique la grande diversité génétique des angiospermes.

Les mécanismes physiologiques développés pour la reproduction végétale sont relativement bien connus (Esau, 1977), mais les mécanismes moléculaires et génétiques qui y sont associés restent beaucoup plus limités. Cependant, nous savons que la double fécondation, régie par plusieurs milliers de gènes, requiert une remarquable coordination cellulaire. De plus, notre compréhension moléculaire des différentes étapes, de la pollinisation jusqu'à la fusion des gamètes, a augmenté considérablement au cours des dernières années grâce à l'innovation d'outils moléculaires. À ce titre, plusieurs gènes impliqués dans ces événements ont été découverts à partir d'études sur des systèmes modèles, dont *Arabidopsis* sp., *Nicotiana* sp. (tabac), *Torenia* sp., *Lilium* sp. (lis), etc. Nos connaissances s'affinent ainsi toujours un peu plus.

1.1 Le développement du sac embryonnaire

Solanum chacoense Bitter, la plante à l'étude dans ce présent travail, est pourvue de fleurs hermaphrodites groupées en cymes. De couleur blanche, chacune comporte cinq sépales et pétales soudés entre eux. Son fruit est une baie, l'équivalent d'une petite tomate très ronde renfermant de nombreuses graines.

Au point de vue microscopique, le gamétophyte femelle, ou sac embryonnaire, se situe au niveau des ovaires, eux-mêmes retrouvés au sein du carpelle. Le carpelle comprend

également un prolongement composé du style et du stigmate, structures essentielles à la réception des grains de pollen. L'ensemble des carpelles constitue le gynécée, l'organe floral femelle. Pour la fleur de *S. chacoense*, le gynécée est qualifié de supère, c'est-à-dire que l'ovaire se situe au-dessus du niveau des autres insertions, et de syncarpe, ou composé de deux carpelles fusionnés (Esau, 1977).

À sa base, l'ovule est rattaché au placenta de l'ovaire par le funicule. Au niveau apical, il est composé du nucelle qui se développera en futur sac embryonnaire (Esau, 1977; Lersten, 2004). Muré entre les téguments, le sac embryonnaire enferme et protège le gamète femelle dont il favorisera la fécondation. Au site d'initiation, le développement de l'ovule commence par de nombreuses divisions cellulaires entraînant la formation d'un primordium. Les premiers stades de la gamétogenèse sont accompagnés par le développement des téguments à partir d'un anneau de cellules entourant le primordium. Avec le temps, les téguments finiront par recouvrir complètement le nucelle, mais ne seront cependant pas fusionnés à l'apex. Ceci créera ainsi une petite ouverture nommée micropyle par laquelle pénétreront les tubes polliniques pour avoir accès au sac embryonnaire (Fig. 1) (Lersten, 2004). L'ovule est qualifié d'anatrope lorsqu'il est entièrement renversé, le micropyle se trouvant à proximité du funicule (Esau, 1977).

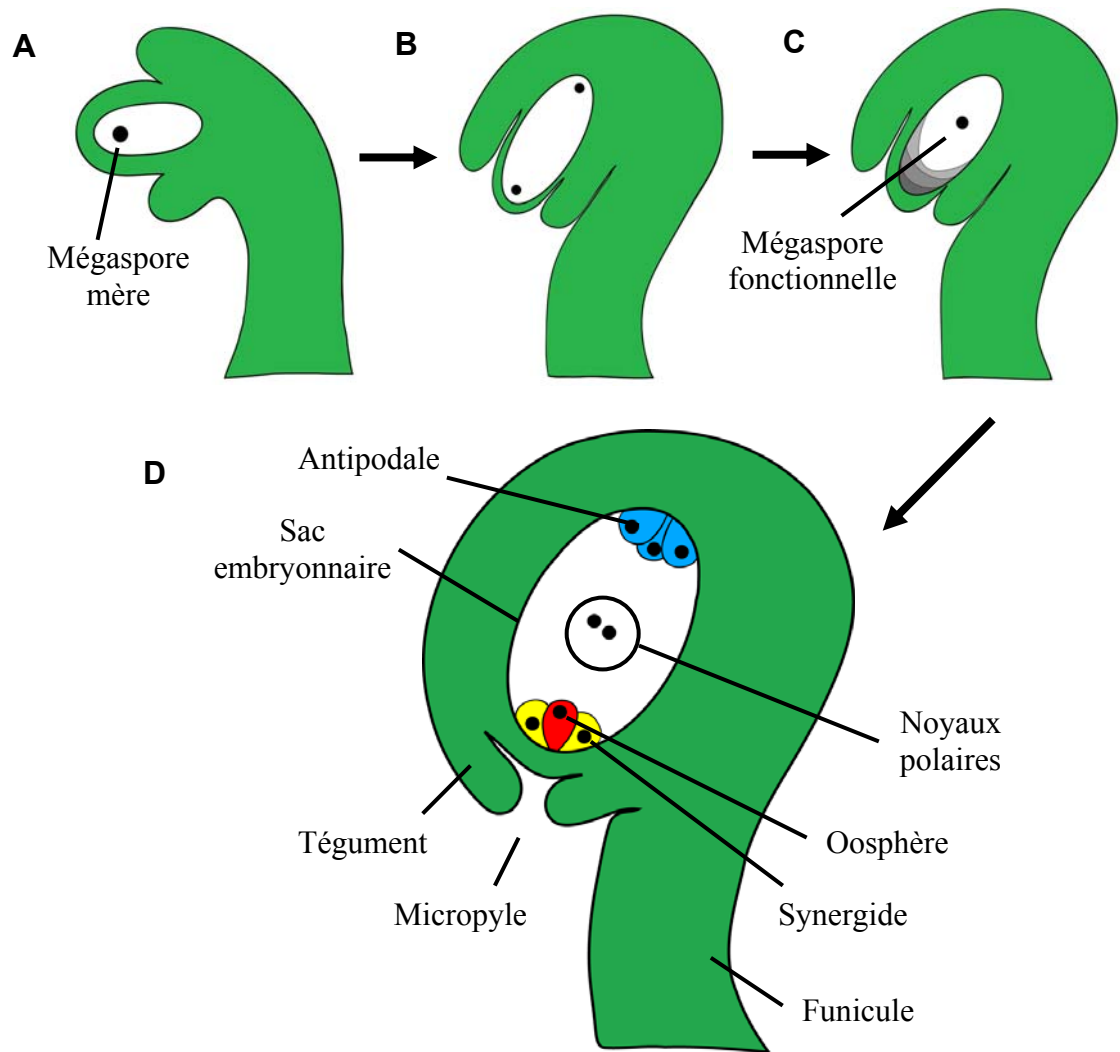
Le développement du sac embryonnaire consiste en une série d'étapes asynchrones. Cette gamétogenèse se déroule en deux phases : la mégasporogenèse et la mégagamétogenèse. Suite à la différenciation de la mégaspore mère (Fig. 1- A) au niveau du primordium d'ovule, deux divisions méiotiques consécutives aboutissent à la formation de quatre mégaspores haploïdes généralement disposées linéairement (phases diade et tétrade) (Fig. 1- B). Pour de nombreuses espèces, dont *S. chacoense*, seule la mégaspore fonctionnelle située dans la partie opposée au micropyle, soit la zone de la chalaze, se différencie en une cellule mononucléée hautement vacuolée. Les trois autres cellules dégénèrent par mort cellulaire programmée (Fig. 1- C), même s'il est courant de

constater, chez d'autres espèces, que deux ou plusieurs mégaspores peuvent survivre pour former le mégagamétophyte (Rees-Leonard, 1935; Lersten, 2004).

La mégagamétogenèse se poursuit par trois divisions mitotiques de la mégaspore fonctionnelle et le déplacement des cellules formées. Dans de nombreux cas, ces divisions aboutissent à la création de huit noyaux répartis en deux groupes de quatre : un groupe à l'extrémité micropylaire et le second à l'opposé, à la chalaze (Friedman and Williams, 2003). Par la suite, un noyau de chaque groupe, ou les noyaux polaires, migre vers le centre de la cellule octanucléée. Alors que les deux noyaux polaires centraux se fusionnent et se dirigent vers le pôle micropylaire, les autres noyaux subissent une cellularisation. Suite à cette dernière étape, le sac embryonnaire mature comprend deux synergides adjacentes à l'oosphère au pôle micropylaire, une cellule centrale binucléée et trois antipodales dans la région de la chalaze (Fig. 1- D) (Reiser and Fischer, 1993; Estrada-Luna, 2004; Lersten, 2004). Près de 70% des angiospermes possèdent ce sac embryonnaire de type Polygonum (Maheshwari, 1950).

Regroupées sous forme triangulaire, la présence des antipodales est éphémère et elles sont rarement observées à maturité chez *S. chacoense*. Leur fonction demeure toujours méconnue (Rees-Leonard, 1935; Reiser and Fischer, 1993). Quant à elles, les synergides demeurent en contact avec la paroi du sac embryonnaire par une structure filiforme (*filiform apparatus*) dense en microtubules. Cette structure jouerait un rôle dans l'absorption des nutriments, dans la sécrétion de substances chimiotropiques nécessaires à l'attraction des tubes polliniques ou représente la porte d'entrée de ces derniers à l'intérieur du sac embryonnaire. En effet, il a été démontré que les tubes polliniques pénètrent les synergides au niveau de cette structure filiforme (Higashiyama, 2002; Kasahara et al., 2005).

Figure 1: Représentation schématique du développement d'un sac embryonnaire de type Polygonum. **A** Stade la mégaspore mère. **B** Stade diade. **C** Fin du stade tétrade avec dégénérescence des mégaspores non fonctionnelles. **D** Sac embryonnaire mature. Une seule paire de téguments est présente chez *S. chacoense*. Les antipodales sont ici représentées à titre indicatif, car elles sont dégénérées à ce stade de développement. Schéma adapté de Reiser and Fischer, 1993.



Mis à part les orchidées (Zhang and O'Neill, 1993), la maturité des ovaires est atteinte lors du développement floral et les ovules sont ainsi complètement formés indépendamment de la pollinisation. Cependant, leur rythme de différenciation s'accélère

suite à la pollinisation. En effet, elle provoque le déclenchement de nombreuses cascades de signalisation moléculaires soigneusement coordonnées dans le temps et l'espace. Les signaux induits par la pollinisation au niveau du stigmate agissent sur d'autres organes floraux, dont les ovaires, où ils finalisent une série de changements structuraux ainsi que le développement général en préparation à la fécondation (O'Neill et al., 1993).

1.2 Le développement des grains de pollen

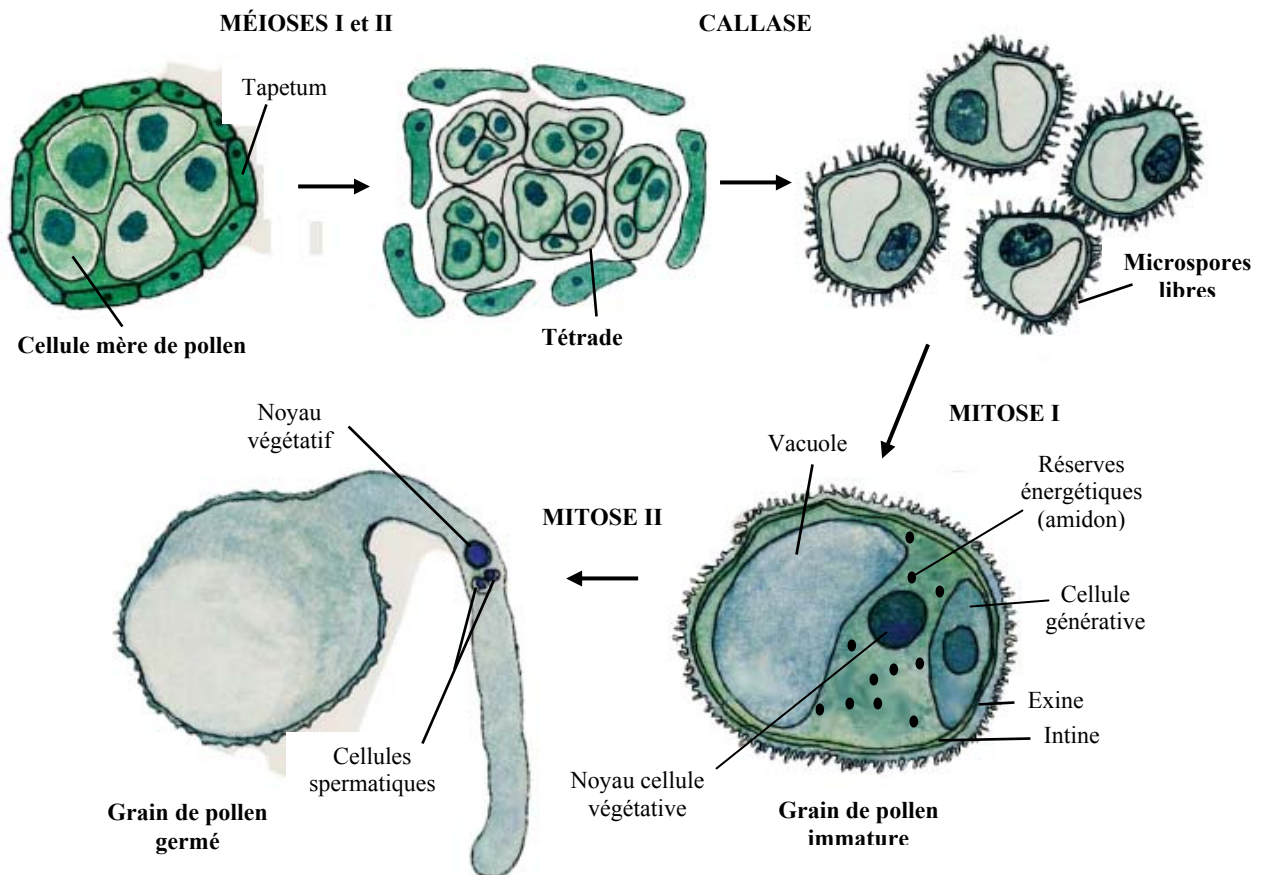
Le grain de pollen, ou microspore contenant le gamétophyte mâle, est une structure haploïde non photosynthétique formé de deux ou trois cellules à maturité. Il se développe dans les locules des anthères jusqu'à leur maturité. À la base des anthères bilobées se situe le filet qui les relie au reste de la fleur. L'ensemble forme l'étamine, l'organe reproducteur mâle (McCormick, 1993). Il est au nombre de cinq contenant deux sacs polliniques chez *S. chacoense*, mais ce nombre varie selon les espèces.

Au cours de la microsporogénèse, les microspores unicellulaires sont produites à partir de la cellule mère et se regroupent par quatre suite à leur méiose (stade tétrade) (Regan and Moffatt, 1990). Sous l'action de la callase sécrétée par le tapetum, la paroi de la tétrade se dissout et la microgamétogénèse débute lorsque les microspores se divisent mitotiquement en deux cellules asymétriques, l'une végétative et l'autre plus petite nommée générative ou reproductrice. Lors de leur maturation, les grains de pollen synthétisent et accumulent de l'amidon, une source d'énergie essentielle à leur germination (Esau, 1977). Le tapetum, retrouvé dans la paroi interne des locules des anthères, est un tissu nourricier nécessaire à la maturation des grains de pollen. De ce tissu sont également produites les sécrétions composant les parois cellulaires interne (intine) et externe résistante (exine) des grains de pollen (McCormick, 1993) (Fig. 2).

À la déhiscence des anthères matures, les grains de pollen sont disséminés par l'intermédiaire de différents agents de pollinisation (Hiscock and Allen, 2008). Chez *S.*

chacoense, la pollinisation est assurée essentiellement par certaines espèces de bourdons ou d'abeilles, dont *Xylocopa ciliata* (Hawkes and Hjerting, 1969). Les longues anthères, caractéristique de la famille des Solanacées, restreignent la libération du pollen aux petites ouvertures, ou pores, à leur extrémité. Les vibrations engendrées par le vol de l'insecte entraînent la sortie des grains de pollen qui se déposent par la suite sur les poils de l'abdomen de l'animal (Esau, 1977).

Figure 2 : Représentation schématique de la microsporogénèse chez la plupart des angiospermes. La mitose I représente la mitose des microspores alors que la mitose II est celle des grains de pollen à maturité. Schéma adapté de McCormick, 2004.



1.3 La double fécondation et la formation des fruits

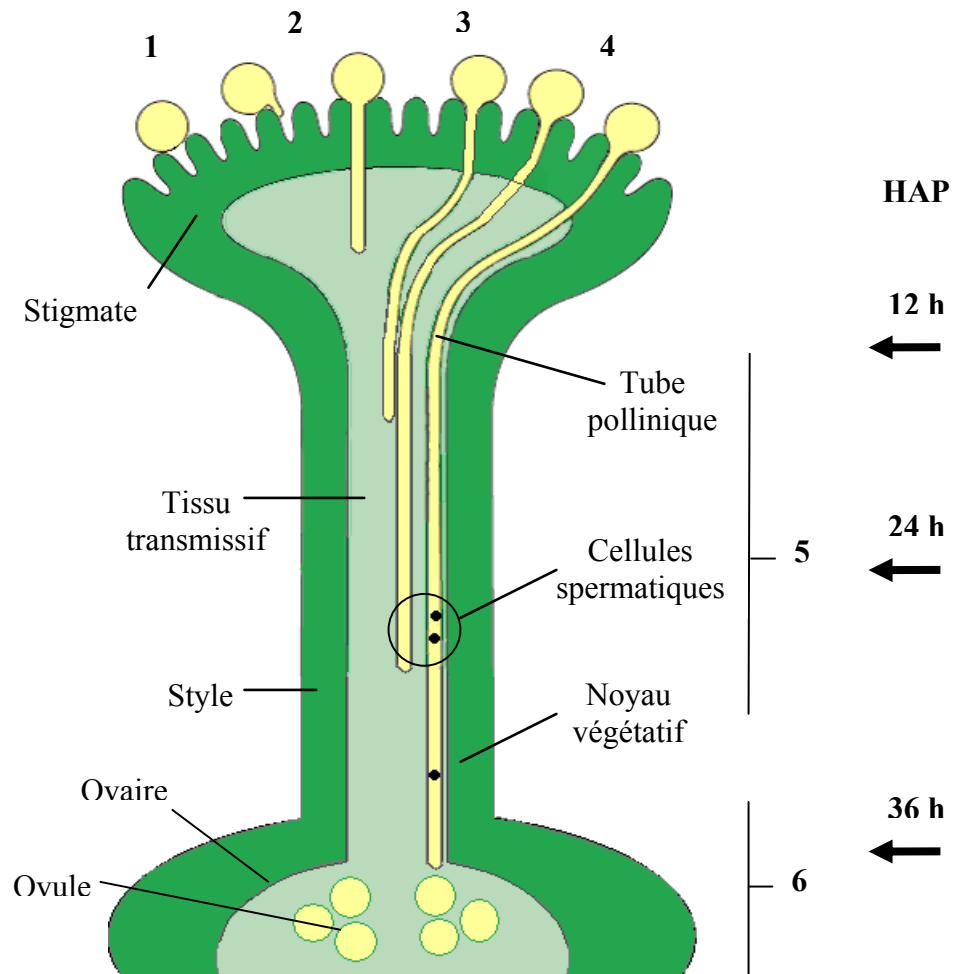
Chez *S. chacoense*, ainsi que pour de nombreuses autres espèces végétales, la double fécondation débute par la déposition de grains de pollen sur les papilles stigmatiques humides. Initialement, les grains de pollen matures sont hautement déshydratés et métaboliquement inactifs. Leur adhérence au stigmate est favorisée par la présence de sécrétions composées entre autres d'enzymes et de lipides dans un mélange complexe de triacylglycérides saturés et insaturés (résumé dans Hiscock and Allen, 2008). Les conditions sont ainsi favorables à leur hydratation, l'activation de leur métabolisme et leur germination. Dans le cas de stigmates humides, la capture des grains de pollen est non-spécifique et l'hydratation qui s'en suit semble passive et non régulée (Swanson et al., 2004). Au contraire, l'adhérence à un stigmate sec, comme chez *Arabidopsis thaliana*, est spécifique et facilitée par la présence de protéines et de lipides particuliers à la surface des grains de pollen (*pollen coat*) (Zinkl et al., 1999).

Lors de sa sortie des anthères, le grain de pollen comporte deux noyaux haploïdes, le noyau reproducteur et le noyau végétatif. Sous le contrôle de ce dernier, le tube pollinique traverse le tissu transmissif du style en direction de l'ovaire pour délivrer les gamètes immobiles qu'il renferme. Le noyau végétatif précède toujours le noyau reproducteur et dégénère lors de son arrivée à l'ovaire. Chez les Solanacées, le noyau reproducteur se divise en deux cellules spermatiques haploïdes lors d'une seconde division mitotique qui se produit au cours de la croissance du tube pollinique (Esau, 1977; McCormick, 1993) (Fig. 2 et 3).

Après pollinisation, environ 36 h sont nécessaires aux tubes polliniques pour atteindre et féconder la majorité des ovules de *S. chacoense* lors d'une pollinisation compatible (Lantin et al., 1999) (Fig. 3). Les tubes polliniques s'orientent vers les ovules en longeant le funicule puis tournent brusquement et précisément pour pénétrer le sac

embryonnaire par le micropyle. Leur croissance cesse alors et leur extrémité se rupture pour libérer leur contenu dans le cytoplasme d'une des synergides, dont la mort cellulaire s'est produite à l'arrivée du tube pollinique (Sandaklie-Nikolova et al., 2007). La deuxième synergide dégénère presque au même moment (Higashiyama et al., 1998) et l'attraction d'autres tubes polliniques est aussitôt inhibée (Huck et al., 2003).

Figure 3 : Représentation schématique temporelle des stades d'interaction entre les grains de pollen de *S. chacoense* et les différents tissus récepteurs femelles. 1- Adhésion des grains de pollen. 2- Hydratation. 3- Germination. 4- Pénétration des tubes polliniques. 5- Croissance à travers le tissu transmissif. 6- Entrée dans l'ovaire et fécondation. HAP : heures après pollinisation. Le temps est une approximation. Schéma adapté de Hiscock and Allen, 2008.



L'une des cellules spermatiques relâchée dans la synergide se fusionne aux deux noyaux polaires du sac embryonnaire pour créer un albumen triploïde ($3n$). La deuxième féconde l'oosphère, formant ainsi un embryon diploïde dont le développement sera suivi de la formation de la graine et du fruit (Swanson et al., 2004). Bref, la participation des deux cellules mâles à ce processus caractérise la double fécondation. La première division nucléaire entraînant la formation de l'albumen se déroule approximativement 48 h après pollinisation. Pour sa part, la division du zygote survient à la suite d'une série de mitoses responsables d'un albumen d'environ 40 cellules (Lee and Cooper, 1958; Dnyansagar and Cooper, 1960) (Se référer à ces articles pour la description détaillée du développement aux différents stades embryonnaires).

La pollinisation et les fécondations qui s'en suivent initient l'abscission sélective des différents organes floraux ainsi que le développement d'un fruit. En effet, cette sénescence lève l'inhibition du développement de l'ovaire. Par contre, en absence de fécondation, la sénescence entière de la fleur est observée (Vivian-Smith et al., 2001; Goetz et al., 2007). Ces événements sont liés, entre autre, à une augmentation de la production d'éthylène (Halevy et al., 1984). Chez les angiospermes, la pollinisation et la double fécondation sont normalement nécessaires pour le développement des fruits et des graines qu'ils contiennent. Cependant, d'autres phénomènes peuvent conduire à la formation de fruits tels la parthénocarpie et l'apomixie. La première est un phénomène naturel ou artificiel au cours duquel les fruits, dépourvus de graines et généralement de taille réduite, sont produits en absence de fécondation. En fait, la présence de graines est essentielle à la croissance du fruit puisqu'elles représentent une source continue de phytohormones (Balbi and Lomax, 2003). Chez certaines espèces, la parthénocarpie peut être induite par l'application exogène de phytohormones qui s'ajoutent à la quantité produite au niveau des ovaires (Gillaspy et al., 1993). La production d'auxine et de gibbérelline est essentielle au développement du fruit et l'éthylène est le principal agent impliqué dans la sénescence du périgone (Vivian-Smith et al., 2001; Olimpieri et al., 2007). Les études sur différents mutants dont la

biosynthèse ou la perception d'hormones est défaillante ont permis de supposer qu'une dérégulation hormonale peut substituer les phénomènes de pollinisation et de fécondation et se traduit généralement par la production de fruits parthénocarpiques (résumé dans Gorguet et al., 2005). Néanmoins, des fruits peuvent également être le résultat d'un avortement plus ou moins tardif des embryons. Pour sa part, l'apomixie est un type de reproduction asexuée qui consiste à la formation de graines et de fruits viables génétiquement identiques à la plante mère, malgré l'omission de la méiose et l'absence de fécondation (Koltunow and Grossniklaus, 2003).

1.4 L'attraction des tubes polliniques

Le guidage et l'attraction des tubes polliniques peut se diviser en deux phases : la phase sporophytique et la phase gamétophytique. Cette dernière peut se subdiviser en une phase funiculaire et une phase micropylaire pour finalement atteindre la phase de fusion des gamètes (Shimizu and Okada, 2000).

1.4.1 La phase sporophytique

Au niveau cellulaire, le tissu transmissif sécrète divers nutriments essentiels à la croissance des tubes polliniques lorsque leurs réserves énergétiques sont épuisés, tel des sucres libres, des acides aminés, des polysaccharides, des glycolipides, des glycoprotéines et des lipides (Labarca and Loewus, 1972; Swanson et al., 2004). Pour les Solanacées, le style est dit solide ou plein par opposition aux styles creux d'espèces tels que le lis. La croissance des tubes polliniques se fait alors à travers les espaces intercellulaires (ou matrice extracellulaire), entre les cellules sécrétoires. Les protéines expansines de même que diverses enzymes, dont les polygalacturonases (EC 3.2.1.15), certaines glucanases (EC 3.2.1.6) et les pectines estérases (EC 3.1.1.11), faciliteraient la pénétration des tubes polliniques (résumé dans Hiscock and Allen, 2008).

Des études ont démontré que les lipides du tissu transmissif entraînent un gradient d'eau qui guiderait les tubes polliniques (Wolters-Arts et al., 1998). Cette réponse hydrophobique représenterait leur attraction initiale (Lush et al., 2000). Toujours sous la forme d'un gradient progressif, les glycoprotéines TTS présentes chez les Solanacées pourraient tracer la voie des tubes polliniques en direction de l'ovaire (Wu et al., 1995). De plus, un gradient d'acide γ -aminobutyrique (GABA) a aussi été identifié comme étant un signal possible de croissance et d'attraction des tubes polliniques. En fait, chez *Arabidopsis*, le gène *POP2* code pour une GABA transaminase (EC 2.6.1.19) qui dégrade la molécule et crée ainsi un gradient croissant d'attraction du stigmate aux téguments internes du micropyle. Cependant, utilisé seul, le GABA ne semble pas suffisant pour attirer les tubes polliniques lors d'essais *in vitro*, ce qui laisse croire que d'autres molécules sont impliquées dans ce processus (Palanivelu et al., 2003). Séparée d'une fraction protéique qui réoriente les tubes polliniques, la petite protéine basique chemocyanine isolée initialement chez le lis semble également les attirer le long d'un gradient de concentrations (Kim et al., 2004), tout comme son orthologue chez *A. thaliana* (Dong et al., 2005). Pour sa part, l'immunolocalisation d'arabinogalactanes (AGPs) au niveau des cellules gamétophytiques micropylaires laisse supposer qu'elles sont impliquées dans le guidage des tubes polliniques, possiblement sous la forme d'oligosaccharides biologiquement actifs (Coimbra et al., 2007).

Les observations faites à partir de systèmes semi-*in vivo* ont démontré que la croissance des tubes polliniques à travers les tissus sporophytiques permet d'acquérir une certaine compétence à répondre au signaux d'attraction ultérieurs (Ray et al., 1997; Palanivelu and Preuss, 2006). La germination des grains de pollen à la surface du stigmate et l'interaction des tubes polliniques avec les tissus femelles au cours de leur passage semblent essentiels à leur guidage ultérieur (Higashiyama et al., 1998). Donc, leur croissance dirigée est assurée par les tissus sporophytiques femelles, mais elle doit être combinée à un signal diffus de courte distance provenant du sac embryonnaire. En effet,

l'analyse de mutants gamétophytiques révèle qu'un ou plusieurs signaux en provenance du gamétophyte femelle joueraient un rôle crucial dans le guidage des tubes polliniques, probablement au cours de deux phases d'attraction séparées, mais complémentaires (Shimizu and Okada, 2000).

1.4.2 La phase funiculaire

Chez le mutant *maa*, le retard dans le développement du gamétophyte femelle permet le guidage des tubes polliniques jusqu'au funicule des ovules, mais le sac embryonnaire n'est pas suffisamment mature pour qu'ils atteignent le micropyle (Shimizu and Okada, 2000). Il est possible de croire que l'attraction au niveau du funicule est contrôlée par un facteur produit très tôt au cours du développement du sac embryonnaire, alors que sa maturité doit être atteinte pour assurer la phase micropylaire (Palanivelu and Preuss, 2006).

1.4.3 La phase micropylaire

Des expériences d'ablation au laser sur *Torenia fournieri*, doté d'un sac embryonnaire nu protubérant, ont démontré que les synergides seraient responsables de l'attraction finale des tubes polliniques à l'approche des ovules. La présence d'une seule synergide intacte semble suffisante à cette attirance (Higashiyama et al., 2001). De plus, le mutant *gfa2* montre que leur dégénérescence n'entre pas en jeu dans ce phénomène puisque la mort cellulaire des synergides s'initie après que le tube pollinique soit parvenu au gamétophyte femelle, mais avant sa décharge (Sandaklie-Nikolova et al., 2007). Ce rôle est également supporté par les études sur le gène *MYB98*, exprimé à la base des synergides d'*A. thaliana*, qui concluent que la structure filiforme est nécessaire entre autre à la sécrétion d'un attractant aux tubes polliniques (Kasahara et al., 2005). *MYB98* régulerait l'expression de gènes requis au guidage et à la formation même de la structure filiforme (Punwani et al., 2007). D'autres études démontrent la participation de la cellule centrale (Chen et al., 2007)

et/ou de l'oosphère (Alandete-Saez et al., 2008) dans l'attraction des tubes polliniques. Récemment, il a été proposé que le gène *MAA3*, codant pour une hélicase, régule la production de molécules d'ARN responsables du guidage des tubes polliniques par les synergides et/ou les autres cellules du sac embryonnaire impliquées dans le phénomène (Shimizu et al., 2008).

L'attraction des tubes polliniques peut être attribuable à la forte concentration en ions calcium des synergides, une idée longtemps soutenue. Cependant, elle est peu valable pour expliquer la spécificité du guidage puisque le calcium est omniprésent chez toutes les espèces végétales (Palanivelu and Preuss, 2006). L'oxyde nitrique (NO), une molécule gazeuse hautement diffusible, semble affecter l'orientation finale des tubes polliniques en direction du micropyle en modulant, entre autre, les concentrations de calcium essentielles à leur croissance (Prado et al., 2008). Chez les mammifères, la fécondation est spécifique à l'espèce par l'interaction de protéines à la surface des cellules sexuelles (Wassarman et al., 2001). Il semble qu'il en soit de même dans le règne végétal (Higashiyama et al., 2006). Lors d'études sur les croisements interspécifiques, la germination et la croissance des tubes polliniques se produisent, mais la majorité d'entre eux ne parviennent pas à délivrer leurs gamètes (Shimizu and Okada, 2000; Escobar-Restrepo et al., 2007). Il est possible de supposer que la synthèse d'une molécule d'attraction de nature protéique, peptidique ou autre soit devenue spécifique à l'espèce au cours de son évolution (Higashiyama et al., 2006). Sécrétée au niveau de la région micropylaire, la protéine ZmEA1 chez le maïs serait une candidate comme molécule d'attraction sur une courte distance (Marton et al., 2005). En effet, il est proposé qu'une molécule de faible poids moléculaire pourrait diffuser et permettre une attraction sur ~100 µm chez *Arabidopsis* (Palanivelu and Preuss, 2006) ou ~200 µm chez *Torenia* (Higashiyama et al., 1998) en culture *in vitro*. Par son évolution rapide, un polypeptide expliquerait de plus la spécificité à l'espèce (Higashiyama et al., 2001). Récemment, il a été découvert que la protéine GEX3, exprimée à la fois au niveau du gamétophyte mâle et de la cellule œuf du sac embryonnaire (Alandete-Saez et al., 2008),

ainsi que la protéine nucléaire CCG, exprimée dans la cellule centrale (Chen et al., 2007), semblent toutes deux nécessaires au guidage des tubes polliniques.

1.4.4 La fusion des gamètes

En comparaison avec le système animal, la fécondation chez les plantes est plus complexe et davantage de partenaires d'interaction y jouent un rôle. Cependant, les différents récepteurs impliqués, autant dans l'attraction des tubes polliniques que dans la fusion des gamètes, demeurent toujours méconnus (Dresselhaus, 2006).

Tout récemment, il a été démontré que le gène *LORELEI* chez *Arabidopsis* code pour une protéine GAP (*glucosylphosphatidylinositol-anchored protein*) fortement exprimée au niveau des synergides et qui serait impliquée dans la signalisation entre les gamètes mâle et femelle. En effet, chez le mutant *lre*, les tubes polliniques sont correctement dirigés vers le sac embryonnaire, mais l'arrêt de leur croissance et la libération des gamètes mâles échouent. De plus, alors que l'attraction des tubes polliniques est inhibée chez le témoin de type sauvage à la suite d'une fécondation, elle demeure active chez le mutant (Capron et al., 2008). Ce phénotype est très semblable à celui observé chez les mutants *feronia* et *sirène*, impliquant un récepteur kinase exprimé dans la structure filiforme des synergides (Huck et al., 2003; Rotman et al., 2003; Escobar-Restrepo et al., 2007). Il est proposé que LRE, en association avec FER, participerait à une cascade de signalisation nécessaire à la réception des tubes polliniques et à la libération des cellules spermatiques (Capron et al., 2008). Aussi, lors d'un croisement compatible, la kinase FER interagirait spécifiquement avec un ligand du tube pollinique pour provoquer l'arrêt de croissance de ce dernier et le relâchement des cellules spermatiques (Escobar-Restrepo et al., 2007).

En accord avec l'idée de fusion préférentielle probablement par la reconnaissance

de certaines molécules à leur surface, des expérimentations *in vitro* laissent croire que les gamètes mâles discriminent les cellules du sac embryonnaire pour ne se fusionner qu'avec l'oosphère et la cellule centrale (Russell, 1985). Chez le mutant *lis*, le destin cellulaire du sac embryonnaire est fortement modifié. Par une série d'examens au niveau des caractéristiques fonctionnelles, morphologiques et moléculaires des différentes cellules du sac embryonnaire, il a été déterminé que les synergides et la cellule centrale adoptent le destin d'oosphères, alors que les antipodales sont remplacées par des cellules centrales. À la suite de la pénétration du tube pollinique, près de la moitié des gamétophytes mutants ne développent pas d'albumen alors que la formation de l'embryon n'est pas affectée. Ceci indique qu'une seule des deux fécondations a eu lieu puisque la cellule centrale n'a pas été reconnue (Gross-Hardt et al., 2007). Les études sur le mutant *eostre*, également affecté dans le destin des cellules du sac embryonnaire, renforce l'hypothèse de reconnaissance entre les gamètes sexuelles (Pagnussat et al., 2007). Par contre, chez *A. thaliana*, il a été récemment démontré que les deux gamètes mâles sont fonctionnellement équivalents et ont des chances égales de se fusionner soit aux noyaux polaires ou à l'oosphère (Ingouff et al., 2009).

Au cours de l'évolution, les plantes ont développé de nombreuses stratégies pour contourner le problème de la polyspermie, ou fécondation du gamétophyte femelle par plus d'un gamète mâle. Une barrière aux fécondations multiples, autant chez les angiospermes que les mammifères, est l'évolution vers la fécondation interne qui restreint le nombre de gamètes mâles en direction du site de fécondation. La régulation de la croissance des tubes polliniques en différentes étapes d'attraction et/ou répulsion (Shimizu and Okada, 2000) et la fusion préférentielle en sont aussi de bons exemples (Scott et al., 2008). Il a été démontré qu'une molécule de répulsion, possiblement de nature peptidique, est sécrétée rapidement après fécondation afin d'éviter le phénomène de polyspermie (Palanivelu and Preuss, 2006). Si le signal d'attraction des tubes polliniques en direction des ovules est de nature protéique ou peptidique, il est aussi possible de croire que ce dernier se dégrade ou se

modifie sous l'action d'une protéase extracellulaire pour enrayer son activité d'attrance (Dresselhaus, 2006).

1.5 Incompatibilité génétique

L'incompatibilité et l'auto-incompatibilité génétiques sont fréquentes pour de nombreuses espèces d'angiospermes et se définissent par l'identité d'allèles sur un ou plusieurs locus des deux plantes impliquées dans la relation (Frankel and Galun, 1977). Par divers mécanismes de reconnaissance et de rejet, les cellules du tissu maternel peuvent discriminer le pollen d'une même espèce ou d'espèces très rapprochées. Pour les Solanacées, l'auto-incompatibilité est dite gamétophytique et survient lorsque le locus d'auto-incompatibilité du grain de pollen (haploïde), ou locus S, contient un allèle qui correspond à l'un des deux allèles du locus S exprimés dans le tissu maternel diploïde. Lors d'une telle réaction, l'hydratation et la germination du grain de pollen ont lieu, mais la croissance des tubes polliniques à l'intérieur du tissu transmissif est ralentie et peut même être rapidement arrêtée. Deux protéines polymorphiques composent le locus S, soit une glycoprotéine pourvue d'une activité ribonucléase (S-RNases), représentant le gène exprimé dans la partie femelle (*Style S*), et une protéine de type F-box, représentant le gène exprimé dans la partie mâle (*Pollen S*). La S-RNase est sécrétée au niveau du stigmate et tout au long du style afin d'inhiber la croissance de tubes polliniques d'une même espèce ou d'un partenaire incompatible (Dodds et al., 1996) et le destin de l'interaction dépend de la dégradation de la S-RNase et/ou de sa séquestration (Hua et al., 2008).

De nombreux facteurs assurent le maintien de l'intégrité des espèces de *Solanum* en restreignant l'échange génique. Dans la plupart des cas, des barrières externes, telles la séparation physique des populations dans le temps et l'espace ou leur adaptation à leur environnement, sont renforcées par des barrières internes. En effet, certaines espèces sympatriques provenant d'une même aire de distribution ne peuvent se croiser entre elles.

Les différentes barrières internes peuvent s'être développées par des divergences génétiques entre des populations séparées (théorie allopatrique) ou à la suite d'une sélection naturelle aboutissant à la formation d'espèces sympatriques (théorie sympatrique) (Summers and Grun, 1981). Ces barrières préviennent la formation d'hybrides à différents niveaux, soit au cours de l'interaction pollen-pistil (stade pré-zygotique ou post-pollinisation) ou lors de la formation même de l'embryon et/ou de l'albumen (stade post-zygotique) (Camadro et al., 2004). La synthèse d'une molécule d'attraction des tubes polliniques spécifique à l'espèce est un exemple de barrière reproductive efficace (Higashiyama et al., 2006).

1.6 Historique de *Solanum chacoense*

Dans la classification traditionnelle, le genre *Solanum* s'insère dans la sous-famille des Solanoideae, elle-même comprise dans la grande famille des Solanacées (Correll, 1962). Regroupant près de 1000 espèces, le genre *Solanum* est le plus répandu au sein de cette famille et également l'un des plus étudié. En effet, il comprend de nombreuses espèces économiquement importantes, dont la tomate (*S. lycopersicum*), l'aubergine (*S. melongena*), la pomme de terre (*S. tuberosum*) et d'autres espèces comprises dans la section *Petota* comme cette dernière (Volkov et al., 2003; Spooner et al., 2004).

Solanum chacoense Bitter a été étudiée pour la première fois en 1911 par Hassler sous le nom de *Solanum guaraniticum*. Ce nom était déjà utilisé dès 1825 par St-Hilaire pour une espèce brésilienne et Bitter lui attribua son nom actuel en 1912. Présente dans les cultures de coton, de maïs et de fèves, les paysans et fermiers argentins lui ont attribué de nombreux surnoms dont « papa de yute » (de la perdrix), « papa del diablo » (du diable), « papa del monte » (sauvage, de forêt ou de montagne), « aguarapapa », « papa silvestre » (sauvage) ou « papa del zorro » (du renard), ce dernier surnom étant également utilisé dans le sud de la Bolivie (Correll, 1962; Hawkes and Hjerting, 1969).

S. chacoense est comprise dans la série *Commersoniana* qui se rapproche de la série *Tuberosa*. Cette espèce de pomme de terre sauvage est fortement répandue du centre de la Bolivie jusqu'au centre de l'Argentine, au Brésil et au Paraguay à une altitude pouvant atteindre 3000 mètres. Elle est considérée comme l'espèce sauvage la plus vigoureuse et la plus polyvalente. En effet, *S. chacoense* se retrouve sur une grande variété de sols et d'environnements différents (Hawkes and Hjerting, 1969). À l'origine confinée aux régions des plaines basses, l'espèce a acquis une adaptation secondaire aux hautes altitudes peut-être par introgression avec certaines espèces montagneuses, dont *Solanum microdontum* (Hawkes, 1962). L'introgression est processus à long terme qui représente le mouvement de gènes provenant d'une espèce particulière vers un ensemble de gènes d'une autre espèce à la suite d'un croisement interspécifique (Miller and Spooner, 1996). L'utilisation de *S. chacoense* dans le cadre de notre étude est tributaire non seulement de sa grande facilité de régénération et de transformation (Birnam et al., 1994; Jan et al., 1996) mais aussi de sa capacité élevée à former des hybrides en nature, une caractéristique importante pour la suite de ce projet (Hawkes and Hjerting, 1969).

1.7 Modules de signalisation impliqués dans la reproduction : MAPK et RLK

En réponse aux différents stimuli externes ou internes et de manière à coordonner les événements entourant le développement du pollen, de l'ovule ainsi que de l'embryon, les plantes ont développé plusieurs techniques spécialisées pour percevoir ces variations et s'y adapter adéquatement. Elles ont ainsi élaboré un réseau de communications cellulaires complexes où diverses voies moléculaires de signalisation sont nécessaires à la connexion et la transmission de signaux perçus par différents récepteurs, dont les récepteurs kinases (Becraft, 2002). Les récepteurs perçoivent l'information par leur domaine extracellulaire spécifique et la transmettent vers l'intérieur de la cellule via leur domaine kinase intracellulaire. Grâce à sa fonction catalytique, le domaine kinase peut transférer un

groupement phosphate d'une molécule d'ATP vers la partie hydroxyle d'une sérine ou d'une thréonine. À la suite d'une cascade de signalisation, le signal est généralement relayé au noyau où les facteurs de transcription assurent l'expression génique correspondant au stimulus initial (Hirt, 2000).

Conservées dans tous les organismes eucaryotes, les MAP kinases sont intégrées dans la famille des protéines sérine/thréonine kinases, incluses elles-mêmes dans la superfamille des protéines kinases eucaryotiques. En général, l'activation des MAP kinases se fait par une cascade de phosphorylation agencée en trois modules protéiques. La perception d'un signal extracellulaire par un récepteur entraîne la phosphorylation du module protéique le plus en amont de la cascade, soit la protéine MAPKK kinase (MAP3K) (Hirt, 2000). Cette MAP3K active la MAP2K suivante par phosphorylation au niveau d'un motif conservé SX₃S/T chez les animaux et SX₅S/T chez les plantes (Yang et al., 2001). Suite à son activation, la MAP2K agit en tant qu'intermédiaire en phosphorylant à son tour une MAPK dans un motif conservé TXY. Une fois transportée vers le noyau, cette dernière phosphoryle finalement des facteurs de transcription, entraînant l'activation de gènes correspondant à une réponse cellulaire appropriée à la situation. Les protéines présentes dans les différents modules d'une voie de signalisation interagissent spécifiquement entre elles. Ainsi, un stimulus peut activer plusieurs voies indépendantes et l'ensemble de ces voies caractérise la spécificité de la réponse cellulaire. Les mécanismes d'activation des différentes composantes sont encore mal caractérisés et nos connaissances actuelles sont plutôt limitées aux deux extrêmes des cascades de signalisation, soit l'identification des récepteurs et des facteurs de transcription (Hirt, 2000).

Les protéines kinases appartenant à la famille des RLK sont connues pour leur rôle dans la croissance et le développement des plantes et quelques unes affectent certains aspects de la reproduction (Becraft, 2002). Alors que le récepteur kinase *Clavata 1* est impliqué dans la régulation de la taille et du maintien des méristèmes (Clark et al., 1997), le récepteur

kinase PRK1, retrouvé chez l'espèce *Petunia*, agit au niveau du pollen et du développement du sac embryonnaire (Lee et al., 1996; Lee et al., 1997). Pour sa part, *Brassica* peut déclencher une réaction auto-incompatibilité sporophytique basée sur ses récepteurs SRK (Goring et al., 1993). Situés au niveau du stigmate, les récepteurs SRK lient le déterminant mâle (SCR) en surface du grain de pollen (Rea and Nasrallah, 2008). Cependant, les RLK sont également impliqués lors de pollinisations compatibles. En effet, le récepteur LePRK2, localisé dans les tubes polliniques en croissance et en complexe avec le récepteur LePRK1, est impliqué dans les interactions pollen-pistil. Son association entre autre avec le promoteur LAT52 de la tomate permet l'initiation et le maintien de cette croissance (résumé dans Hiscock and Allen, 2008). Nous savons que le récepteur kinase LePRK2 semble essentiel à la maturation des grains de pollen ainsi qu'à la déhiscence des anthères (Mizuno et al., 2007) alors que des études à partir du mutant gamétophytique femelle *feronia* ont permis de déterminer que le gène *FER* code pour un récepteur kinase localisé dans l'invagination filiforme des synergides et possiblement impliqué dans un mécanisme de barrière reproductive (Escobar-Restrepo et al., 2007).

Chez les plantes, les MAP kinases sont généralement impliquées dans les voies de signalisation en réponses aux stress biotiques et abiotiques, aux interactions plantes-pathogènes, à la régulation du cycle cellulaire, à la perception de diverses hormones telles l'éthylène et l'auxine ainsi qu'aux voies de signalisation régissant le développement des organes et de l'embryon (résumé dans Zhang et al., 2006). Jusqu'à tout récemment, peu de protéines kinases de la famille des MAPK avaient été impliquées dans le développement chez les végétaux. La phosphorylation de ces protéines peut représenter une étape de régulation importante pour son activité intrinsèque et une rupture dans la cascade de signalisation peut se traduire par un défaut du développement (Gray-Mitsumune et al., 2006). Par exemple, une mutation sur le gène *YODA* chez *A. thaliana*, un gène codant pour une MAP3K, montre un défaut majeur dans le développement des stomates et de l'embryon (Bergmann et al., 2004; Lukowitz et al., 2004). Toujours chez *Arabidopsis*, les MAP

kinases MPK3 et MPK6 régulent le développement des stomates, des inflorescences et des anthères, mais stimulent aussi la division cellulaire des téguments embryonnaires (Wang et al., 2008). Récemment, il a été découvert que la protéine LeCTR2 retrouvée chez la tomate agirait à la fois dans la voie de l'éthylène, mais également dans les systèmes de défense et le développement de la plante (Lin et al., 2008). Chez le tabac, la protéine kinase NtMEK2 est, pour sa part, impliquée dans la germination des grains de pollen (Voronin et al., 2004). Le gène *ACR4* d'*Arabidopsis* joue un rôle dans l'embryogenèse (Tanaka et al., 2002) alors que son homologue chez le maïs, *CR4*, contrôle la différenciation de l'épiderme (Becraft et al., 1996). Finalement, il a été prouvé qu'une surexpression de la protéine ScFRK2 chez *S. chacoense* affecte le développement de l'ovule et, du même coup, la formation des graines et des fruits (Gray-Mitsumune et al., 2006). De plus, un développement incomplet et un défaut structural des grains de pollen sont des phénotypes retrouvés chez le mutant surexprimant le gène *ScFRK2* (O'Brien et al., 2007).

1.8 Présentation du projet de recherche et les résultats antérieurs

La protéine kinase ScFRK1 (*Solanum chacoense* Fertilization-Related Kinase 1), une MAP3K (Fig. 4- B), a été découverte lors d'un criblage par sélection négative visant à découvrir des gènes faiblement exprimés et impliqués dans la fécondation ainsi que le développement embryonnaire chez *S. chacoense* (Germain et al., 2005). Elle partage environ 45% d'identité de séquence en acide aminé avec les protéines kinases MAPKKK 19, 20 et 21 chez *Arabidopsis thaliana* (Fig. 4- A). L'ADNc de *ScFRK1* mesure 1553 pb et code pour une protéine de 320 aa (Fig. 17), dont le domaine catalytique kinase constitue la majeure partie de la protéine. Selon les analyses d'expression de type Northern, la taille de l'ARNm est d'environ 1,6 kb (Kapfer, 2003). Des analyses par PCR sur la portion correspondant à l'ADNc semblent indiquer l'absence d'intron et le transfert de Southern suggère de 2 à 4 copies de ce gène dans le génome de *S. chacoense*. Avec ses 11 sous-

domaines, sa séquence est caractéristique des protéines comprises dans la famille des MAP kinases (Caron, 2002). Pour le moment, aucune protéine interagissant avec ScFRK1 n'a été découverte.

Les études ultérieures ont démontré que la protéine ScFRK1 est exprimée essentiellement dans les ovaires non pollinisés ainsi qu'au niveau des styles (Fig. 6- A et B). L'accumulation de *ScFRK1* est fortement influencée par la pollinisation et la fécondation (Caron, 2002). De plus, le patron d'expression de l'ARNm au niveau des ovaires et des styles n'est pas constant selon le stade de développement floral (Kapfer, 2003). Ces résultats suggèrent donc un rôle probable durant la fécondation ou avant qu'elle ait lieu et ouvrent la voie à de nombreux questionnements concernant le rôle de la protéine dans la reproduction.

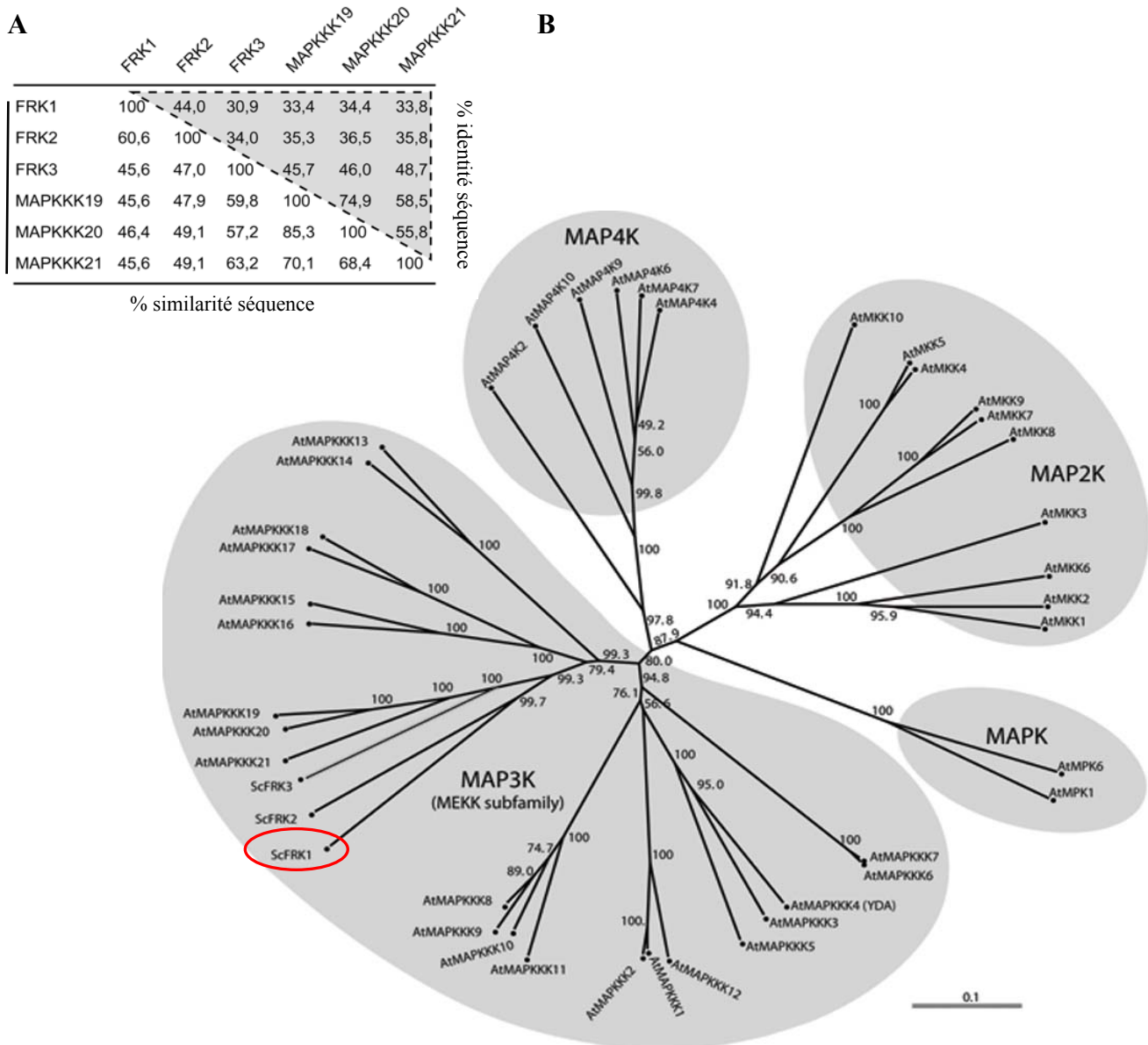
Des mutants sous-exprimant *ScFRK1* ont été générés afin de vérifier les effets phénotypiques reliés à cette modification et ainsi déterminer la fonction du gène. De ces lignées mutantes, trois ont été utilisées au cours de cette étude. La lignée *Scfrk1* AS13 proviennent de constructions antisens, alors que les lignées *Scfrk1* S1 et S27 dérivent de constructions sens co-supprimées. L'analyse phénotypique macroscopique révèle de petits fruits contenant très peu de graines (Fig. 7- C). De plus, une analyse de type Northern révèle une très faible expression de *ScFRK1* à l'anthèse dans chacune de ces lignées et cette expression est corrélée avec le phénotype de petits fruits (Fig. 7) (Kapfer, 2003).

Cette étude porte donc sur la caractérisation de la protéine ScFRK1 dont une sous-expression affecte à la fois le développement du gamétophyte femelle, entraînant ainsi la formation de petits fruits parthénocarpiques, mais également celui du gamétophyte mâle. Puisque le développement du sac embryonnaire semble problématique, nous voulions observer quel est l'impact de ce défaut sur le guidage des tubes polliniques à l'intérieur d'un système semi-*in vivo*. Par ce procédé, nous avons aussi testé l'hypothèse de spécificité

du signal d'attraction en utilisant diverses espèces de *Solanum* proches de *S. chacoense*. À partir de ces mêmes espèces, nous avons également tenté d'établir la phylogénie du gène *ScFRK1*. Cette phylogénie a été appuyée par divers croisements interspécifiques de *Solanum* sp. qui nous ont permis, par la même occasion, d'approfondir nos connaissances sur les possibilités de croisement interspécifiques et la discrimination élevée au niveau du guidage entre espèces rapprochées.

Le projet a initialement débuté avec les plants contrôles Sc582, l'un des parents de ScG4. Cependant, cette lignée a été délaissée au profit de sa descendance dont le niveau de transformation est nettement supérieur. La séquence de *ScFRK1* à l'intérieur de ScG4 a été étudiée et utilisée pour déterminer sa séquence promotrice et les éléments de régulation situés en amont. C'est ainsi que nous avons remarqué qu'elle est très semblable à celle retrouvée dans la lignée Sc582 à l'exception de quelques différences, dont l'addition d'une base azotée qui modifie ainsi le cadre de lecture et crée un allèle à la première séquence de *ScFRK1* (Fig. 17). L'obtention de cette séquence a également permis la réalisation de constructions de délétion et de complémentation du promoteur *ScFRK1* (Fig. 18). Les délétions de promoteur insérées dans des plants témoins ScG4 expriment le gène rapporteur GUS et servent à déterminer quelle section de la séquence promotrice est spécifique à l'expression observée lors des hybridations *in situ* (au niveau des cellules de la zone micropylaire et téguments à maturité). Pour leur part, les constructions de complémentation à partir des mutants *Scfrk1* S1 permettent de reconstituer le phénotype d'origine, soit le développement d'un sac embryonnaire fonctionnel à maturité.

Figure 4 : Analyse de séquence de ScFRK1. **A** Identité de séquence en acides aminés (triangle gris) et similarité entre les représentants du groupe FRK (FRK1, 2 et 3) et ses orthologues chez *Arabidopsis thaliana* (MAPKKK19, 20 et 21). **B** Arbre phylogénétique de la famille des MAP kinases. L'arbre a été obtenu par la méthode Neighbor-Joining. Les valeurs Bootstrap supportant chaque branche proviennent de 1000 répliquas. Les séquences d'*A. thaliana* ont été obtenues à partir du site TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>). L'analyse phylogénétique se base sur le domaine kinase catalytique. La longueur des branches est proportionnelle au nombre de substitutions et l'échelle représente ce nombre par site (Gray-Mitsumune et al., 2006).



2. Matériel et Méthodes

2.1 Matériel végétal

Les travaux ont été réalisés à l'aide de plants de la pomme de terre sauvage diploïde ($2n=2x=24$) *Solanum chacoense* Bitt., provenant originalement de la Potato Introduction Station (Sturgeon Bay, WI) et généreusement offerts à notre laboratoire suite aux travaux du Dr. Mario Cappadocia (IRBV, Université de Montréal). Les différentes lignées utilisées sont auto-incompatibles sur différents allèles. Les lignées témoins ScG4 et ScV22 possèdent les allèles d'auto-incompatibilité $S_{12}S_{14}$ et $S_{11}S_{13}$ respectivement (Luu et al., 2001). Les lignées mutantes *Scfrk1* S1, S27 et AS13, dérivées de ScG4, ont été utilisées au cours de cette étude (Kapfer, 2003).

Les plantes proviennent de cultures *in vitro* stériles en conditions contrôlées. Un taux d'humidité de 100% à l'intérieur des tubes de croissance, une température ambiante d'environ 22-24°C, une durée d'éclairage de 16 h et une durée d'obscurité de 8 h sont maintenus dans les chambres de croissance. Dès que les plants atteignent une hauteur d'environ 10 cm, ils sont transférés dans un module d'acclimatation dans les serres extérieures où des conditions de croissance similaires sont initialement conservées. Le taux d'humidité est ensuite diminué progressivement. Après une période d'acclimatation de 3 semaines, les plants sont prêts à être cultivés dans les serres du Jardin Botanique de Montréal avec une température ambiante d'environ 22-26°C et une durée d'ensoleillement de 14-16 h (lumière naturelle additionnée d'un éclairage artificiel).

2.2 Création d'hybrides par croisement

Toutes les pollinisations ont été effectuées par l'expérimentatrice. Dans le cas des différentes espèces sauvages de *Solanum*, les croisements interspécifiques ont été effectués

sur des fleurs à l'anthèse pour les espèces auto-incompatibles ou à la suite d'une émasculature de bourgeons floraux 1 jour avant l'anthèse pour les espèces auto-compatibles. Ces croisements ont été réalisés en utilisant le pollen de ScV22 sur les différentes espèces de *Solanum* et vice-versa.

Lorsque présents, les fruits ont été récoltés et mesurés un mois suivant la pollinisation. L'extérieur de ces mêmes fruits a été stérilisé à l'éthanol 100% pour une dizaine de minutes et leurs graines ont été disposées stérilement sur un milieu $\frac{1}{2}$ MS solide afin d'observer une germination. À leur apparition, les plantules des hybrides sont transférées sur des milieux MS charbon jusqu'à ce qu'elles atteignent une taille suffisante pour être cultivées en serre. Après avoir photographié leur aspect externe et interne, le nombre de graines par fruit a été déterminé.

2.3 Observations en contraste interférentiel différentiel (DIC)

Avant leur récolte, les bourgeons floraux correspondant aux différents stades de développement sont mesurés à l'aide d'un vernier (Scienceware, Bel-Art Products). Les tissus sont maintenus sur de la glace jusqu'à la dissection des organes floraux nécessaires à l'analyse. Une fois libérés, ces derniers (ovaires et styles) sont conservés sur de la glace sèche jusqu'à leur utilisation.

Les ovaires sont fixés environ 48 h à température ambiante dans une solution FAA (1% formaldéhyde 37%, 0,5% acide acétique, 50% éthanol). Les tissus sont ensuite éclaircis graduellement au salicylate de méthyle à température ambiante : 1 h dans une solution 3 volumes d'éthanol : 1 volume de salicylate de méthyle, 1 h dans une solution 1 : 1, 1 h dans une solution 1 : 3 et finalement dans l'agent éclaircissant pur uniquement. Les ovules sont disséqués sous la loupe binoculaire (stéréomicroscope StereoV12 de Zeiss)

et observés en mode DIC du microscope AxioImager 1 de Zeiss équipé d'une caméra AxioCam HRc (Carl Zeiss Canada).

2.4 Observations de la viabilité des grains de pollen et de la microsporogénèse

La viabilité des grains de pollen a été observée suite à leur coloration au carmin acétique (acide acétique 45%, acéto-carmin 1%). De même, une coloration des anthères à différents stades de développement à l'iode 0,1% a permis d'observer l'accumulation d'amidon à l'intérieur des grains de pollen.

La méiose et le développement des microspores ont été observés à la suite d'une coloration de pollen frais à l'orcéine lacto-acétique (1% orcéine) selon la méthode décrite par Dyer (Dyer, 1963), mais en remplaçant l'acide propionique par de l'acide acétique.

Les observations ont été effectuées à l'aide du microscope AxioImager 1 équipé d'une caméra AxioCam HRc de Zeiss.

2.5 Guidage des tubes polliniques

2.5.1 Système de croissance semi-*in vivo*

Le pollen utilisé pour effectuer les pollinisations sur des fleurs du témoin ScG4 (S₁₂S₁₄) à l'anthèse provient de plants transgéniques Sc1022-1 (S₁₁S₁₃) créés par Hugo Germain au cours de l'année 2006. Le croisement est alors parfaitement compatible. Le pollen exprime constitutivement la protéine de fluorescence verte (GFP) sous le contrôle d'un promoteur pollen spécifique (LAT52). Initialement, le génotype Sc1022-1 a été sélectionné entre autre pour son haut degré de régénération *in vitro*. Il provient d'un

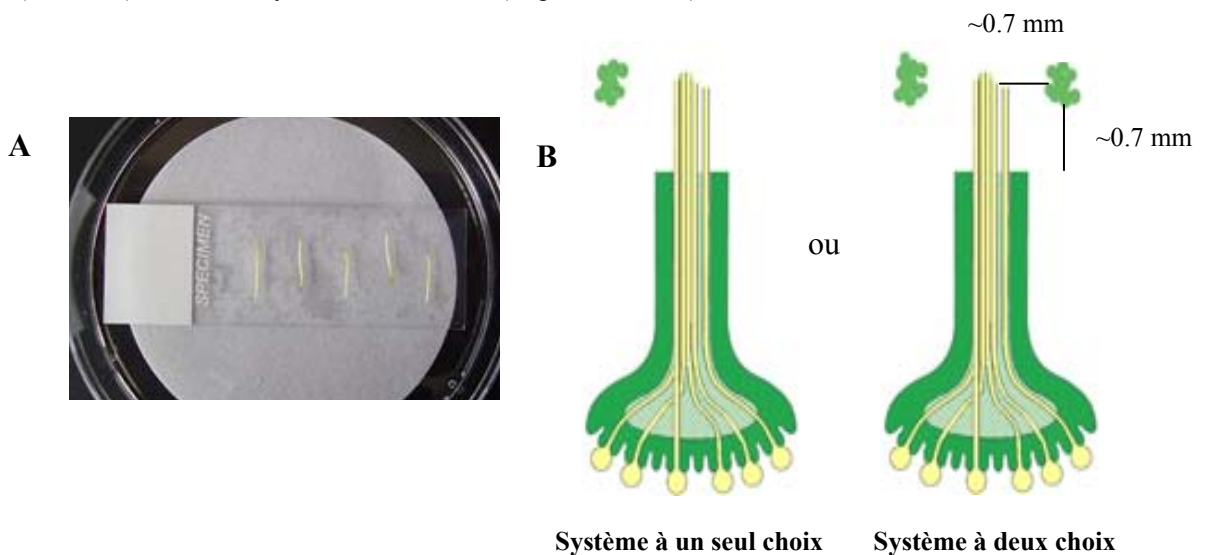
croisement entre un plant femelle SP10 ($S_{13}S_{13}$) et d'un plant mâle ScV22 ($S_{11}S_{13}$). Avant d'effectuer la pollinisation, le pollen est étendu sur une lame de manière à le diluer et ainsi contrôler sa quantité.

Le système semi-*in vivo* est composé d'une lame sur laquelle se retrouve une fine couche de milieu (10% saccharose, 0,03% $CaCl_2$, 0,01% H_3BO_3 , 1% agarose Low melting, pH ~6,5-7,0) qui assurera la croissance des tubes polliniques en surface de ce milieu lors de leur sortie des styles. Les styles des fleurs ScG4, 24 h après leur pollinisation par le pollen transgénique, sont déposés uniformément de manière à ce que l'extrémité coupée soit en contact avec le milieu. Les styles sont placés anti-parallèlement, évitant ainsi une interférence dans la trajectoire des tubes polliniques à leur sortie. Après leur dissection en milieu aqueux, une dizaine d'ovules de fleurs à l'anthèse toujours maintenus entre eux par le placenta sont positionnés à ~0,7 mm de l'extrémité du style. Le système est ensuite installé dans une boîte contenant un papier absorbant mouillé, assurant ainsi un environnement humide (Fig. 5). L'incubation dure approximativement 24 h à température ambiante. Les observations ont été faites sous illumination UV à partir du stéréomicroscope StereoV12 de Zeiss pourvu d'un filtre GFP et équipé d'une caméra AxioCam HRc (Carl Zeiss Canada).

Des ovules du témoin ScG4, du mutant *Scfrkl* S1 ainsi que de la plante SP10 ($S_{13}S_{13}$) (Luu et al., 2001), un génotype provenant d'une autopollinisation au stade bourgeon (« self bud pollination ») de Sc582 ($S_{13}S_{14}$) et caractérisé par une faible proportion de sacs embryonnaires fonctionnels, ont été utilisés pour les tests de guidage. Des ovules d'autres espèces du genre *Solanum* proches de *S. chacoense* ont aussi été testés. Les graines de ces dernières espèces ont été obtenues à partir de l'USDA, Regional Potato Introduction Project, Department of agriculture (Sturgeon Bay, WI) (voir Annexe 1 pour la description de commande pour chaque espèce utilisée). Les représentations schématisées et les photos correspondantes à chaque espèce se retrouvent en annexe de ce présent ouvrage

(voir Annexe 3), alors que les caractéristiques physiologiques de chacune sont élaborées dans le livre « The Potato and Its Wild Relatives » (Correll, 1962). Pour les essais basés sur la nature protéique du ligand, des ovules du témoin ScG4 ont été testés après avoir été bouillis pendant 5 min afin d'assurer une dénaturation des protéines.

Figure 5 : Système semi-*in vivo*. **A** Positionnement anti-parallèle des styles. **B** Représentation schématique du positionnement des ovules à l'extrémité des styles coupés dans un système à un seul choix (d'un côté) ou dans un système à deux choix (de part et d'autre).



Les plantes de ces espèces ont été cultivées dans les serres du Jardin Botanique de Montréal. Mis à part la tomate (*Solanum lycopersicum* ou *Lycopersicon esculentum*) et *Solanum tuberosum* subsp. *andigena*, toutes les espèces choisies sont diploïdes et auto-incompatibles. La diploïdie de chaque espèce a été confirmée par l'observation du nombre de chloroplastes à l'intérieur des stomates foliaires. Pour ce faire, une fine pellicule foliaire est retirée et déposée sur une lame de microscope contenant une solution d'iode 0,1%.

2.5.2 Statistiques

Pour chaque essai semi-*in vivo*, l'attraction, la répulsion ou l'indifférence des tubes polliniques, en présence des ovules testés, ont été déterminées par la courbure dans la trajectoire de la majorité d'entre eux par rapport à un prolongement fictif du style. Lors d'un contrôle négatif, ou en absence d'ovule, les tubes polliniques empruntent une trajectoire aléatoire ou bien ils poursuivent leur chemin en ligne droite concentrée (Fig. 11). Les angles de courbure des tubes polliniques n'ont cependant pas été mesurés. Les données des essais de guidage ont ensuite été compilées et analysées statistiquement.

Pour les essais où des ovules d'une espèce étaient testés d'un seul côté des styles (système à un seul choix), nous avons analysé si l'essai différait du résultat obtenu avec le contrôle ScG4 par la méthode du khi carré (χ^2) avec le logiciel informatique JMP 8, SAS (Sall, 2005). Ce test représente une comparaison entre deux essais, c'est-à-dire que nous comparions les résultats obtenus pour un essai avec ceux du contrôle ScG4. Nous testions donc l'hypothèse qu'il existe une différence de guidage entre l'essai testé et le contrôle. Le test de χ^2 nous a permis de mesurer la probabilité associée à cette hypothèse. Lorsque la probabilité (p) associée au test était inférieure au seuil classique de 0,05, nous pouvions déduire qu'il y avait une différence significative d'attraction entre l'essai et le contrôle. Une valeur de probabilité supérieure à 0,05 signifie qu'il n'y a pas de différence significative entre les deux essais.

Pour les essais de compétition où les tubes polliniques étaient confrontés aux ovules du contrôle ScG4 ainsi qu'aux ovules de l'espèce testée (système à deux choix), tous deux équidistants de l'extrémité du style (Fig. 5- B), nous avons analysé nos résultats par un test binomial où deux hypothèses statistiques peuvent s'appliquer. L'hypothèse nulle, ou H_0 , postule qu'il n'y a pas de différence entre les fréquences des deux choix. Pour sa part, l'hypothèse alternative, ou H_1 , postule que la fréquence des choix s'écarte significativement

du hasard. La probabilité d'aller d'un coté ou de l'autre était donc de $\frac{1}{2}$ (distribution binomiale) et la fréquence de chacun est fixée à 0,5. Les tubes polliniques qui n'ont pas tournés n'ont pas été pris en considération dans les calculs statistiques, n'étant ni considérés comme des échecs ou des succès. Les probabilités (p) ont été calculées à partir du programme SPSS17, Analyse non paramétrique test binomial. Lorsque la probabilité était inférieure au seuil classique de 0,05, nous devons rejeter l'hypothèse nulle et déduire qu'il y avait préférence vers les ovules du contrôle. Dans certains cas, un effet significatif aurait pu être observé dans des conditions plus contrôlées et/ou avec un effectif plus grand.

2.6 Observations de la croissance des tubes polliniques

Afin de visualiser l'arrêt des tubes polliniques à l'intérieur d'un style, des fleurs sont récoltées 24 h ou 48 h après pollinisation et fixées pour au moins 24 h dans une solution de Carnoy (75% éthanol, 25% acide acétique). Les fleurs fixées sont ensuite rincées sous l'eau et traitées 1 h à 60°C dans une solution de NaOH 8 N. Après rinçage à l'eau, les styles sont retirés et colorés sur une lame de microscope avec quelques gouttes d'une solution 0,1% de bleu d'aniline (dissolution dans du K_3PO_4 0,1 N). Une légère pression est appliquée afin d'écraser les tissus et ainsi permettre la visualisation des tubes polliniques (Martin, 1959). Les observations ont été faites sous illumination UV à partir du microscope AxioImager 1 de Zeiss pourvu d'un filtre DAPI et équipé d'une caméra AxioCam HRc (Carl Zeiss Canada). Pour chaque croisement testé, la longueur du style a été mesurée de même que celle de la croissance des tubes polliniques à l'intérieur du style.

2.7 Analyse de type Northern

2.7.1 Récolte des tissus

Les tissus floraux sont récoltés comme décrit au point 2.2 directement sur les plants témoins ScG4 ou sur les plantes transgéniques (*Scf1rk1* S1, S27 ou AS13).

2.7.2 Extraction d'ARN

Les tissus sont broyés dans un mortier pré-refroidi à l'azote liquide. La poudre est pesée pour obtenir une quantité suffisante à l'extraction d'ARN. L'extraction est faite à l'aide d'un kit (RNeasy® Plant Mini kit de QIAGEN) ou par la méthode d'extraction au Trizol reagent. L'ARN est finalement quantifié par spectrophotométrie à une absorbance de 260 nm et la qualité de chaque échantillon extrait est vérifiée sur gel d'électrophorèse.

2.7.3 Migration et transfert sur membrane

La méthode utilisée est tirée en partie du manuel « Molecular Cloning », p. 7.43-7.50 (Sambrook et al., 1989). Une fois resuspendus dans une solution de MOPS/EDTA, formaldéhyde 1% et formamide 50%, 10 µg de chaque échantillon sont chargés dans un gel d'électrophorèse contenant 6% de formaldéhyde et soumis à un voltage de 100 V. La solution de migration (MOPS/EDTA 1%) est changée une fois au cours de la migration. Trois lavages consécutifs du gel d'une durée de 2 min à l'eau permettent d'enlever un maximum de formaldéhyde. À deux reprises, le gel est traité pendant 15 min dans une solution dénaturante (50 mM NaOH, 10 mM NaCl). Le traitement du gel se poursuit dans une solution de neutralisation (0,1 M Tris-HCL pH 7,5) pour 15min suivi d'une étape d'équilibration de 30 min (SSC 20 X).

Le transfert des ARN se fait par capillarité sur une membrane de nylon Hybond-N+ (GE Healthcare) comprise dans un montage installé pour une nuit entière. La membrane est récupérée le lendemain et brièvement rincée dans une solution SSC 6X. Après un traitement dans une enceinte UV crooslinker (UVC 500, Hoefer) à 120 J/cm² d'énergie, la membrane est scellée hermétiquement et conservée à -20 °C.

2.7.4 Préparation de la sonde

La sonde correspond à l'ADNc de *ScFRK1* dans son intégrité, soit 1,5 kb, provenant du plant contrôle Sc582. La sonde est créée selon les instructions de la trousse « StipEZ DNA kit » (Ambion) et marquée à l' α -³²P dATP (PerkinElmer, BLU512H). Une fois purifiée dans une colonne Sephadex G-50 (Roche Diagnostic), l'activité radioactive de la sonde est mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation liquide (Tri-Carb 2800TR, PerkinElmer).

Une sonde correspondant à un fragment de 1 kb d'ARN 18S de *S. chacoense* a été utilisée comme sonde contrôle afin de s'assurer de quantités d'ARN égales par puit.

2.7.5 Préhybridation, hybridation et lavages

La préhybridation d'environ 1 h et l'hybridation avec la sonde radioactive se font à l'aide d'un tampon formamide (50% formamide déionisé, 1% d'ADN de sperme de saumon dénaturé, SSC 6X, 10% Denhardt's, 1% SDS) dans un four à hybridation ajusté à 45°C (Hybridization Incubator 400, Robbins Scientific). Le lendemain de l'hybridation, les membranes sont lavées successivement. Le premier lavage se fait à température ambiante durant 1 h dans une solution 2X SSC; 0,1% SDS. Les lavages se poursuivent avec une solution 1X SSC; 0,1% SDS en contact avec les membranes 30 min à 25°C suivi d'une

seconde incubation de 30 min à 45°C. Le dernier lavage de 10 min s'effectue à 55°C dans une solution 0,1X SSC; 0,1% SDS.

2.7.6 Exposition de la membrane

La membrane hybridée est exposée sur un écran au phosphore et révélée au PhosphoImager (Typhoon 9200, GE Healthcare) pour une période variable selon l'importance de l'activité émise. L'activité radioactive est détectée à l'aide d'un compteur Geiger.

Pour la sonde contrôle 18S, la membrane a d'abord été traitée comme recommandé par le manufacturier (Ambion). Les lavages post-hybridation de 30 min se sont faits à 60°C dans une solution 0,1X SSC; 0,1% SDS.

2.8 Analyse de type Southern - « Garden blot »

2.8.1 Récolte des tissus

Les spécimens utilisés proviennent principalement du jardin extérieur des plantes économiques ou des serres du Jardin Botanique de Montréal. Des feuilles sont récoltés directement sur les plants et conservés sur de la glace. Les tissus sont finalement broyés et conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation. Un spécimen de chaque espèce est placé à l'intérieur d'une presse afin d'être séché dans un four ventilé à 37°C. Un spécimen d'herbier est ainsi disponible à titre de référence (Voir Annexe 2).

2.8.2 Extraction d'ADN génomique

L'extraction peut se faire à l'aide d'un kit (DNeasy® Plant Mini kit de QIAGEN) ou par la méthode d'extraction au CTAB tirée du manuel « Methods in *Arabidopsis*

research », p. 177-178 (Koncz et al., 1992). Une modification a été apportée à ce dernier : deux lavages à l'éthanol 70% (V/V) sont effectués après la dernière précipitation à l'éthanol. L'ADN génomique est finalement quantifié par spectrophotométrie et la qualité de chaque échantillon extrait est vérifiée sur gel d'électrophorèse.

2.8.3 Migration et transfert sur membrane

Des échantillons de 10 µg d'ADN génomique de chaque espèce ont été digérés toute une nuit à 37°C avec l'endonucléase EcoRI (New England Biolabs). Le lendemain, les échantillons sont précipités à l'éthanol et resuspendus avec 16 µl d'H₂O pour ensuite être chargés dans un gel d'agarose 1%/TAE. La qualité et la digestion des échantillons sont vérifiées sur gel. Les étapes subséquentes sont identiques à celles décrites pour les hybridations de type Northern (point 2.7.3).

2.8.4 Préparation de la sonde, hybridation et exposition de la membrane

Les techniques de marquage et d'hybridation de l'ADN génomique sont identiques à celles décrites pour les hybridations de type Northern (points 2.7.4 et 2.7.5). La préhybridation et l'hybridation se font cependant dans un four à hybridation ajusté à une température de 42°C. L'exposition des membranes s'effectue de la même manière que celle décrite pour l'hybridation de type Northern (point 2.7.6).

2.9 Analyses phylogénétiques

2.9.1 Amplification PCR

D'après le résultat obtenu par le « Garden blot » (Fig. 12), l'ADNg des espèces où la sonde *ScFRK1* s'est fixée (*Solanum bulbocastanum*, *Solanum commersonii*, *Solanum chacoense*, *Solanum microdontum*, *Solanum pinnatisectum*, *Solanum tarijense*, *Solanum*

tuberosum, *Solanum lycopersicum* (ou *Lycopersicon esculentum*) – Voir Annexe 1) a été amplifié avec les amorces correspondant à la séquence ITS (*internal transcribed spacer*). *Nicotiana tabacum* a été utilisée comme espèce hors groupe. Les numéros de récolte des spécimens d'herbier sont disponibles à l'annexe 2. Les numéros d'accèsion Genbank de chacune des séquences utilisées seront disponibles lors de la parution de l'article portant sur le sujet de ce présent travail. La réaction d'amplification a été effectuée sur environ 10 ng d'ADNg avec du tampon de réaction 1X, 1 mM MgCl₂, DMSO 6X, 1% BSA, 6x10⁻³ % Tween, 0,2 mM dNTPs, 1,25 U Taq DNA polymérase (BioShop) et 1 µM de chacune des amorces spécifiques suivantes : AB101 et AB102 dont les séquences sont 5'-acgaattcatggtcggtgaagtgttcg-3' et 5'-tagaattccccgggttcgctcgccgttac-3' respectivement (Douzery et al., 1999). La réaction a été soumise à la programmation suivante : 2 min à 94°C ; 35 cycles comprenant une étape de 30 sec à 94°C, une étape de 30 sec à 48°C et une étape de 1 ½ min à 72°C ; 7 min à 72°C suivi d'un refroidissement à 10°C. La totalité des produits d'amplification ont migré dans un gel d'agarose 1%/TAE pour ensuite être purifié selon le protocole de la trousse « Gel extraction kit » (QIAGEN). Les séquences obtenues ont une taille d'environ 850 pb.

2.9.2 Séquençage

La matrice comprend les séquences d'ITS obtenues en laboratoire ainsi que les séquences de *S. commersonii* et *S. tarijense* provenant de Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov). L'ADN a été séquencé directement sur les produits PCR purifiés à l'Institut de recherche en immunologie et oncologie (IRIC) de l'Université de Montréal. La correction des séquences a été réalisée à l'aide du logiciel MacVector 8.1.2 (Accelrys). Le programme BLAST (Altschul et al., 1997), disponible sur le site du NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), a été utilisé pour réaliser la recherche de similarités de séquences à l'intérieur de base de données et ainsi confirmer les séquences obtenues.

Les séquences ont été alignées avec le logiciel BioEdit v.1.6.0 (Hall, 1999) puis corrigées manuellement. Les « indels » (insertions/délétions) ont été codés avec le logiciel Seqstate v.1.32 (Müller, 2006) en utilisant le modèle « simple indel coding » (Simmons and Ochoterena, 2000). La matrice de 893 pb (29 pb ont été retirés de l'analyse dû à la difficulté de l'alignement) comprend 71 indels et a été analysée par parcimonie avec le logiciel PAUP* : Phylogenetic Analysis Using Parsimony, v.4.0 (Swofford, 2003) en utilisant une stratégie de recherche exhaustive. L'espèce *N. tabacum* a été utilisée comme extra groupe pour l'enracinement de l'arbre obtenu puisqu'il s'agit d'une espèce exclue du genre *Solanum* (Bohs and Olmstead, 1997).

2.10 Construction de transgènes

La séquence promotrice de *ScFRK1* et les éléments de régulation en amont ont été isolés à partir de la banque d'ADNg correspondant au gène selon le protocole de « GenomeWalker™ Universal Kit » (Clontech) (Amorce gène spécifique 1 : 3'-actcagaatggctcaacatacaagact-5' et Amorce gène spécifique 2 : 3'-agaatcgtcagaatgagtagtacaagc-5'). Ainsi, des amorces ont été générées dans le but d'obtenir des fragments de différentes tailles de la séquence promotrice obtenue (Délétion FRK1 #1 : 3'-attgcagaacaatttcagacg-5' ou Délétion FRK1 #2 : 3'- attgcagaacaatttcagact-5', Complémentation FRK1 : 3'-taaactataaccaaatacgaatgtg-5', Amorce 2000 : 5'-gtataatttcagtagtgaagtctgaaa-3', Amorce 1000 : 5'-tttatgtaactttctctgatttagt-3', Amorce 600 : 5'-ttttgtagtgattgttttcgataact-3', Amorce 300 : 5'-tatatcgagttatcttaaagttggca-3', Amorce 150 : 5'-gaaaatattgaatagaatttgcctac-3').

Ces fragments ont permis d'effectuer des constructions de délétion et de complémentation du promoteur *ScFRK1* (Fig. 19). Seuls les constructions de complémentation comportant la section promotrice 1000 pb et 600 pb ainsi que les délétions promotrices -1000 pb, -600 pb et -300 pb ont été réalisées au cours de ce projet.

Le séquençage de la section 2000 pb de la séquence promotrice n'a pas fonctionné, nous empêchant d'obtenir le fragment nécessaire aux constructions.

Pour nous faciliter la tâche, un clonage directionnel a été effectué d'après le système « Gateway® Cloning- Recombination Enzymes » d'Invitrogen autant pour les délétions que les complémentations. Ce système permet le transfert de nos inserts entre différents vecteurs grâce à des recombinaisons sites spécifiques. Le plasmide pMDC162, contenant un gène de résistance à la kanamycine ainsi que le gène GUS, a été utilisé afin de modifier l'expression de *ScFRK1* (Curtis and Grossniklaus, 2003). L'expression du gène rapporteur, visible par une coloration bleue, nous indique que la section de la séquence promotrice testée permet l'activité enzymatique. Le produit est aussi quantifiable d'après l'intensité de la coloration qui varie selon l'activité du promoteur. Cette coloration révèle également l'expression spatiale puisqu'elle est spécifique aux cellules qui expriment le gène (point 2.12).

Les produits de clonage finaux ont ensuite été transformés par choc thermique dans la souche bactérienne *Escherichia coli* TOP10 rendues compétentes précédemment par la méthode au CaCl₂ tirée du manuel « Molecular Cloning », p. 1.82-1.83 (Sambrook et al., 1989). Les cultures bactériennes provenant des colonies transformées ont ensuite été préparées afin d'extraire les plasmides selon la méthode « Small-scale preparation of plasmid DNA » du manuel « Molecular Cloning », p.1.25-1.28 (Sambrook et al., 1989). Une cartographie de restriction avec l'endonucléase *EcoRV* a permis de confirmer la présence des inserts d'intérêt à l'intérieur des plasmides.

2.11 Production de plantes transgéniques

2.11.1 Transformation de la bactérie *Agrobacterium tumefaciens*

Selon les recommandations du manufacturier, la souche bactérienne électrocompétente *Agrobacterium tumefaciens* LBA-4404 a été transformée par électroporation (Cell Porator, Life Technologies) avec les différentes constructions énumérées au point 2.10. Après récupération des bactéries transformées dans une solution YEP (1% yeast extract, 1% peptone, 0,5% NaCl) à 28°C pour environ 2 h, les bactéries sont sélectionnées sur un milieu YEP agar contenant les antibiotiques kanamycine (pour la sélection du plasmide) et streptomycine (pour la sélection de la bactérie). À partir des colonies obtenues, une pré-culture avec les antibiotiques appropriés est incubée environ 3 jours à 28°C avec agitation légère. Par la suite, un ensemencement de 20 ml permet d'obtenir une culture en phase exponentielle.

2.11.2 Préparation des tissus foliaires et induction avec la bactérie transformée

La création des futures plantes transgéniques s'est réalisée à partir de jeunes plantules de *S. chacoense* de la lignée ScG4 ou transgéniques *Scfrk1* S1 provenant d'une culture *in vitro*. La technique de transformation est adaptée à partir de la méthode décrite dans (Matton et al., 1997). Une quantité suffisante de feuilles sont découpées aseptiquement en petits morceaux. Ces tissus foliaires sont placés sur un milieu d'induction A solide (3% saccharose, 1 mg/L acide naphthaleneacétique, 9 mg/L 6-benzylaminopurine, vitamines MS, sels MS, 100 µM acétylsyringone, agar) et conservés 24 h à l'obscurité à température ambiante.

Les tissus foliaires sont ensuite mis en contact avec une suspension d'*A. tumefaciens* transformée contenue dans du milieu d'induction A liquide dépourvu d'acétosyringone. Suite à une infection d'une heure avec légère agitation, les tissus sont replacés sur le milieu d'induction A solide. Les tissus foliaires des témoins positifs et négatifs n'entrent pas en contact avec la bactérie.

2.11.3 Traitement des tissus foliaires

Après deux jours sur le milieu d'induction A, les tissus foliaires sont transférés sur un milieu d'induction B solide (3% saccharose, 1 mg/L acide naphthaleneacétique, 9 mg/L 6-benzylaminopurine, vitamines MS, sels MS, 500 mg/L céfotaxime, 50 mg/L kanamycine, agar). Le témoin positif est placé sur un milieu d'induction B ne contenant pas d'antibiotique. Les milieux sont renouvelés à toutes les semaines jusqu'à l'apparition de cals au pourtour des tissus. Les tissus foliaires sont alors placés sur un milieu de régénération (3% saccharose, 3 mg/L 6-benzylaminopurine, vitamines MS, sels MS, 200 mg/L céfotaxime, 50 mg/L kanamycine, 5 mg/L gibbérelline GA₃, agar) renouvelé à toutes les semaines jusqu'à l'obtention de plantules. Les plantules sont repiquées sur des milieux MS charbon inclinés (sels MS, vitamines MS, saccharose, agar, charbon) et cultivés tel que décrit dans la section Matériel végétal (point 2.1) jusqu'à l'obtention de fleurs.

2.12 Analyse des plantes transgéniques

2.12.1 Plantes transgéniques pour l'analyse de délétions de promoteur : révélation de l'activité enzymatique GUS

La méthode utilisée est tirée du manuel «*Arabidopsis, A Laboratory Manual*», p. 243-248 (Weigel and Glazebrook, 2002). Les fleurs des transgéniques de délétion de promoteur sont récoltées dès leur apparition. Les ovaires sont disséqués des fleurs et une

petite incision à leur base facilite la pénétration de l'agent fixateur (acétone 90% froid). Après une incubation de 20 min à température ambiante, les échantillons sont lavés sur glace avec le tampon de coloration sans X-Gluc (0,5 M tampon sodium phosphate (pH 7,2), 10% Triton X-100, 100 mM potassium ferrocyanide, 10 mM potassium ferricyanide). La solution de coloration contenant le X-Gluc à une concentration finale de 2 mM est ensuite ajoutée pour une incubation sous vide et sur la glace de 15-20 min. Le X-Gluc est un substrat à la β -glucuronidase codée par le gène GUS. La dégradation de ce substrat par l'enzyme produit un intense précipité bleu. L'incubation se poursuit à 37°C avec agitation jusqu'à l'apparition d'une coloration bleue, généralement jusqu'au lendemain. Les échantillons sont ensuite traités successivement 30 min à l'éthanol 20%, 35% et 50% à la température ambiante pour finalement être fixés au FAA dans les mêmes conditions. Par la suite, après un lavage à l'éthanol 70%, les échantillons peuvent se conservés pour une longue durée à 4°C.

Après une coloration à l'éosine Y pour la distinction cellulaire, la moitié des spécimens de chaque lignée testée sont enrobés à la paraffine selon le protocole décrit dans le manuel «Arabidopsis, a laboratory manual», p. 245-248 (Weigel and Glazebrook, 2002). Des modifications au protocole sont cependant envisagés afin d'optimiser la coloration, l'enrobage et le déparaffinage. Les blocs de paraffine sont conservés à 4°C avant leur coupe au microtome. De plus, pour chacun des spécimens, 50 ovaires de fleurs à l'anthèse ont été récoltés et conservés à -80°C pour une analyse de type Northern.

2.12.2 Transgéniques de complémentation de promoteur

Pour leur part, les constructions de complémentation à partir des mutants *Scfrk1* S1 n'ont pas fonctionné. La transformation a donc été effectuée avec ScG4.

Pour chaque spécimen transformé, environ 5 fruits ont été récoltés 1 mois après pollinisation avec le pollen ScV22 afin de calculer leur diamètre ainsi que le nombre de

graines par fruit. Lorsque le phénotype était différent de celui du contrôle ScG4, une dizaine d'ovaires de fleurs à l'anthèse pour chaque spécimen ont été fixés au FAA pour un futur éclaircissement au salicylate de méthyle (point 2.3). Les spécimens éclaircis sont conservés à température pièce. Pour ces mêmes spécimens, 50 ovaires de fleurs à l'anthèse seront récoltés et conservés à -80°C pour un éventuel Northern.

3. Résultats

3.1 Expression spatio-temporelle de *ScFRK1*

Les études antérieures ont démontré que le gène *ScFRK1* est exprimé principalement dans les ovaires non pollinisés ainsi qu'au niveau des styles (Fig. 6- A et B). Nous savons aussi que l'accumulation de *ScFRK1* est fortement influencée par la pollinisation et la fécondation. En effet, les niveaux de transcrits chutent rapidement immédiatement après une pollinisation compatible, ou lorsque le pollen entre en contact avec le stigmate. Finalement, les transcrits disparaissent environ 36 HAP, soit au moment de la fécondation alors que les tubes polliniques atteignent les ovules (Fig. 6- A) (Caron, 2002). De plus, le patron d'expression de l'ARNm au niveau des ovaires et des styles n'est pas constant au cours du stade de développement floral. En premier lieu, il est plus élevé dans les ovaires, particulièrement à la période allant de -1 j à l'anthèse (0 j) (Fig. 6- B) (Kapfer, 2003). Ces résultats ont d'ailleurs été confirmés (résultats non présentés. Lafleur, E. et Matton, D. P).

Afin de déterminer l'expression spatiale de *ScFRK1*, Madoka Gray-Mitsumune et moi-même avons réalisé une série d'hybridations *in situ* sur de jeunes bourgeons floraux ou sur des ovaires à l'anthèse du génotype de type sauvage ScG4. Les hybridations sur des ovaires à l'anthèse ont permis de détecter l'expression du gène *ScFRK1* dans les ovules ainsi que dans les tissus vasculaires, tel le placenta (Fig. 6- C, i). Plus précisément, le signal se perçoit au niveau des téguments eux-mêmes connectés à l'épiderme du placenta (Fig. 6- C, iii). La microscopie DIC a permis une meilleure observation des structures cellulaires et nous remarquons qu'au sein des ovules, l'expression se confine à la zone micropylaire, plus spécifiquement au niveau des synergides et possiblement de la cellule œuf. Les synergides sont facilement repérées par leur large vacuole (Fig. 6- C, v). Alors qu'ils mesurent environ 2 mm, les très jeunes bourgeons floraux amorcent le développement de leurs ovules au stade précoce de la mégaspore mère. À ce stade, le gène *ScFRK1* s'exprime essentiellement dans la partie distale des téguments en croissance de même que dans la mégaspore mère (Fig. 6- C, vii). Parallèlement, le gène est détecté dans les cellules mères de pollen enfouies

dans les anthères en croissance qui commencent à se différencier. (Fig. 6- C, ix). Ce même signal n'est cependant pas détecté lorsque le pollen atteint sa maturité. Des hybridations sur des bourgeons à des stades plus avancés sont à prévoir pour déterminer le patron d'expression en fonction du développement.

3.2 Caractérisation phénotypique des lignées mutantes *Scfrk1*

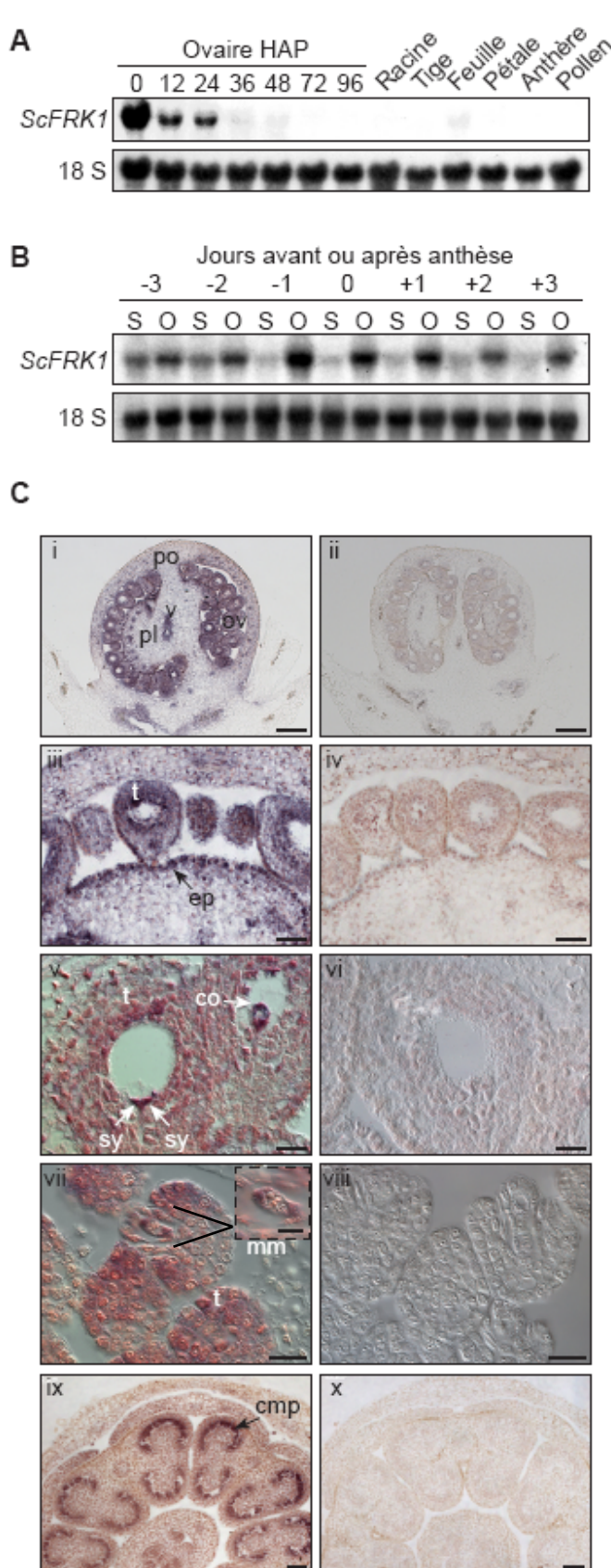
Le phénotype de petits fruits retrouvé chez les mutants sous-exprimant *ScFRK1* est corrélé avec un très faible nombre de graines, probablement causé par une diminution du nombre de fécondations. De ce nombre, aucune graine avortée n'a été observée. Par contre, la croissance et le développement végétatif ne semblent pas affectés dans les trois lignées transgéniques. En comparaison, le volume des fruits de la lignée *Scfrk1* S1 est d'environ 13% de celui des fruits du contrôle ScG4 et de 35-40% pour les deux autres lignées. La production de graines est pareillement affectée par cette sous-expression. La lignée *Scfrk1* S1 ne produit qu'environ 2% du nombre de graines normalement retrouvées dans les fruits de *S. chacoense*. Les lignées *Scfrk1* S27 et AS13 ne présentent qu'environ 15% de la normale (Fig. 7). Ce nombre réduit en graines explique la petitesse des fruits obtenus dans ces lignées. De plus, à l'anthèse, l'analyse de type Northern révèle une très faible expression de *ScFRK1* dans chacune de ces lignées et cette expression est corrélée avec le phénotype de petits fruits (Fig. 7- B).

3.2.1 Observations macroscopiques

3.2.1.1 Observations des organes femelles et des fruits

Les observations phénotypiques faites auparavant se sont concentrées sur les fruits et les graines. Quoique peu nombreuses, les graines contenues dans les fruits des lignées mutantes sont viables. En effet, la germination *in vitro* de plantules hybrides à partir d'embryons dérivés de ces graines est une technique efficace.

Figure 6 : Expression spatio-temporelle de *ScFRK1*.



A Expression de l'ARNm de *ScFRK1* dans différents organes chez *S. chacoense*, lignée témoin type sauvage génotype G4. Les ovaires fécondés ont été récoltés entre 0 et 96 heures après pollinisation. HAP: Heures après pollinisation. (Image tirée de Caron, 2002).

B Expression de l'ARNm de *ScFRK1* en fonction du stade de développement floral chez la lignée contrôle ScG4. O : Ovaires, S : Styles (Image tirée de Kapfer, 2003).

C Hybridation *in situ* de *ScFRK1* sur des coupes longitudinales (i à viii) ou transversales (ix à x) de 10 μ m d'épaisseur de bourgeons floraux de la lignée contrôle ScG4. i- ii Bourgeon floral non fécondé à l'anthèse. Échelle 200 μ m. po : paroi de l'ovaire. v : tissu vasculaire. ov : ovules. pl : placenta. iii-iv Agrandissement d'une section de bourgeon floral non fécondé à l'anthèse. Échelle 50 μ m. t : tégument. ep : épiderme placentaire. v-vi Ovules à l'anthèse observés en contraste interférentiel différentiel (DIC). Échelle 20 μ m. t : tégument. co : cellule œuf. sy : synergides. vii-viii Jeunes ovules de bourgeons floraux mesurant \sim 2 mm (stade mégaspore mère). Échelle 20 μ m. t : tégument. mm : mégaspore mère. L'encadré de vii représente un agrandissement de la zone de la mégaspore mère. ix-x Jeunes anthères de bourgeons floraux mesurant \sim 2 mm. Échelle 50 μ m. cmp : cellules mères de pollen.

ii, iv, vi, viii et ix représentent les témoins négatifs, sonde sens. La sonde antisens marquée à la digoxigénine est visible par une coloration rouge-violette.

D Représentation schématique d'un ovule pourvu d'un sac embryonnaire de type *Polygonum*. af : appareil filiforme. cc : cellule centrale. co : cellule œuf. f : funicule. mp : micropyle sy : synergides. v : vacuole. Schéma adapté de Punwani and Drews, 2008.

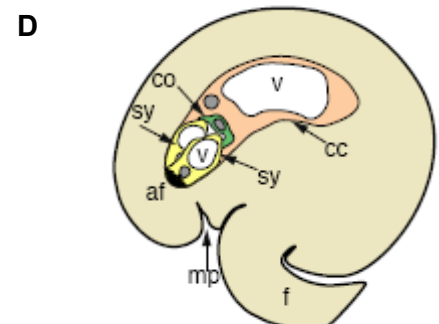
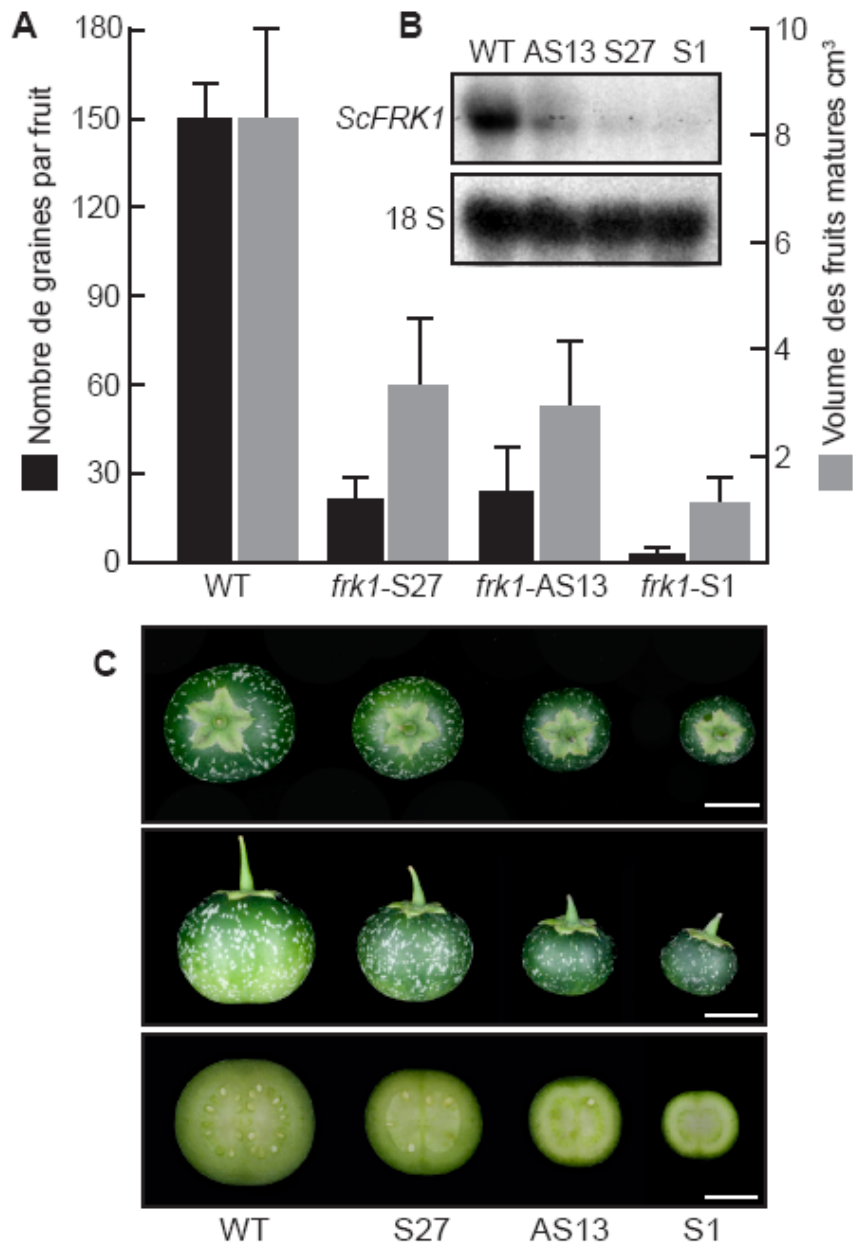


Figure 7 : Analyses phénotypiques des fruits des lignées transgéniques. **A** Graphique de croissance et de développement des fruits matures du contrôle ScG4 (WT) et des différentes lignées mutantes *ScFRK1* 30 jours après pollinisation avec le pollen ScV22. **B** Analyse de *ScFRK1* sur les plantes transgéniques. Expression de l'ARNm de *ScFRK1* et de l'ARNr 18S de tissus ovariens provenant de plantes WT, de la lignée antisens AS13 et des lignées co-supprimées *ScFRK1* S1 et S27 (Image tirée de Kapfer, 2003). **C** Phénotype au niveau des fruits du contrôle ScG4 (WT) et de la lignée mutante *ScFRK1*. Fruits 1 mois après pollinisation. Échelle 1 cm.



Nous avons remarqué que, contrairement à ces petits fruits, les ovaires de la lignée *Scfrkl* S1 et les ovules qui y sont contenus sont plus volumineux que ceux de la lignée contrôle. Cette constatation s'applique peu importe le stade de développement des ovules (données des superficies des ovules en μm^2 réalisées par Théo Stafford-Richard non présentées). Cependant, le nombre d'ovules semble constant, indépendamment de la mutation. Les bourgeons floraux sont également un peu plus gros et plus allongés que la moyenne. Le tableau I représente la correspondance entre la longueur des bourgeons floraux du contrôle ScG4 et le stade de développement du gamétophyte femelle de ces derniers. Ainsi, les valeurs de correspondance ne sont que des approximations. Cette corrélation représente un outil utile pour retrouver rapidement des bourgeons à un certain un stade de développement chez le type sauvage plutôt que chez la lignée mutante.

Longueur	Stade de développement
1,0 - 1,5 mm	Primordium d'ovule
1,5 - 2,5 mm	Mégaspore mère
2,5 - 3,0 mm	Diade
3,0 - 4,0 mm	Tétrade et Mégaspore fonctionnelle
4,0 - 5,0 mm	Sac embryonnaire Uninucléé et Binucléé
5,0 - 6,0 mm	Sac embryonnaire Tétranucléé et Octanucléé
Ouverture florale- Anthèse	Sac embryonnaire mature (dégénérescence des antipodales)

Tableau I : Corrélation entre la longueur du bourgeon floral et le stade de développement du gamétophyte femelle chez *S. chacoense*. Les longueurs de correspondance sont données à titre approximatif et certains stades de développement peuvent se chevaucher.

La corrélation entre la longueur des bourgeons floraux et le stade de développement de ces derniers a facilité et accéléré leur analyse. Lorsque les bourgeons floraux mesurent ~ 2 mm ou moins, ils sont généralement refermés par les sépales et ce n'est qu'à 3 mm qu'apparaissent les pétales verts tendre à leur extrémité. À mesure que les bourgeons

grossissent, les pétales se distinguent de plus en plus des sépales. À ~4 mm, la longueur des pétales verts tendre à l'extrémité des sépales équivaut au quart de la longueur de ces derniers alors qu'elle représente la moitié de leur longueur lorsque le bourgeon mesure ~5 mm. À 6 mm, la longueur des pétales blancs verdâtres égale la longueur des sépales. Une fois qu'ils atteignent une longueur de 7 mm, les bourgeons floraux sont toujours fermés et les pétales blancs ne laissent entrevoir que partiellement les anthères jaunes. Par la suite, les bourgeons peuvent s'ouvrir facilement au toucher, au stade où les pétales blancs laissent entrevoir les anthères jaunes.

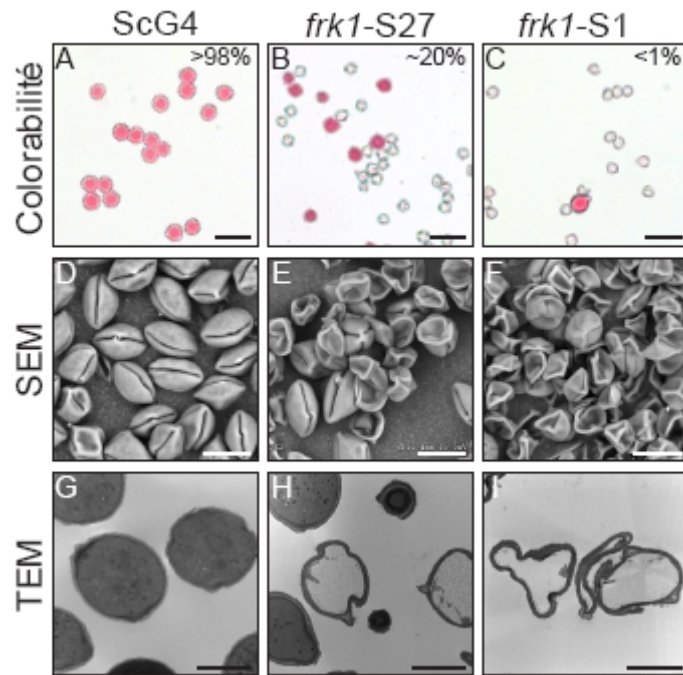
3.2.1.2 Observations des anthères et de la morphologie des grains de pollen

Alors que la morphologie des anthères et le moment de leur déhiscence semblent normaux, les observations des grains de pollen révèlent un défaut au cours de leur développement. Certaines de ces observations, sur des grains de pollen provenant d'anthères déhiscentes des lignées mutantes et du témoin type sauvage, ont permis de déterminer leur viabilité. En fait, nous avons utilisé le carmin acétique qui colore le cytoplasme des grains de pollen viables suite à l'entrée du colorant par transport actif. Alors que le taux de colorabilité au carmin acétique est supérieur à 98% pour le témoin, il n'est que d'environ 20% pour *Scfrkl* S27 et inférieur à 1% pour *Scfrkl* S1 (Fig. 8- A, B et C). Pour chaque lignée, plus de 1000 grains de pollen ont été observés afin d'établir ces pourcentages.

De plus, cette faible viabilité se reflète sur les pollinisations compatibles effectuées sur le plant ScV22 (allèles d'auto-incompatibilité $S_{11}S_{13}$). Le pollen des mutants *Scfrkl* S1 et S27 (mutants effectués dans le génotype ScG4) a été utilisé pour réaliser ces croisements de même que celui du pollen du génotype ScG4 (allèles d'auto-incompatibilité $S_{12}S_{14}$) en tant que contrôle. Dans ce dernier cas, la totalité des pollinisations effectuées se sont développées en fruits (n=20). En présence du pollen provenant de la lignée *Scfrkl* S27, seule une pollinisation sur 20 a permis la production d'un fruit viable, alors que le

rendement est nul en présence du pollen de la lignée *Scfrk1* S1. À la lumière de ces résultats, il est possible de supposer que le développement du pollen de ces lignées sous-exprimantes soit problématique, affectant ainsi sa viabilité et, du même coup, son potentiel de pollinisation.

Figure 8 : Viabilité des grains de pollen chez *S. chacoense*. A-C Coloration au carmin acétique. Les grains de pollen viables ont une teinte rosée. Échelle 50 μ m. D-F Observations des grains de pollen en microscopie électronique à balayage (SEM). Échelle 20 μ m. G-I Observations des grains de pollen en microscopie électronique à transmission (TEM). Échelle 10 μ m. Les échantillons et les observations D à I ont été effectués par D. P. Matton et Charles Bertrand (Université de Sherbrooke). J Tableau du nombre de fruits formés lors de croisements compatibles effectués sur le plant contrôle ScV22 (n=20).



J

Pollinisations sur ScV22 (S ₁₁ S ₁₃)	
ScG4 (S ₁₂ S ₁₄)	20/20
<i>Scfrk1</i> -S1	0/20
<i>Scfrk1</i> -S27	1/20

3.2.2 Observations microscopiques

3.2.2.1 Observations des grains de pollen

Des observations de pollen frais en microscopie électronique à balayage ont également permis de visualiser l'aspect externe des grains de pollen et ainsi le comparer au témoin. Nous avons remarqué qu'une forte proportion des grains de pollen des lignées mutantes semblait repliés sur eux-mêmes, comme s'ils étaient desséchés (Fig. 8- D, E et F). La microscopie électronique à transmission sur des sections de pollen révèle que ces mêmes grains de pollen sont dépourvus d'un cytoplasme dense et d'organelles (Fig. 8- G, H et I).

Pour déterminer à quel moment un défaut survient au cours du développement des grains de pollen, une analyse cytologique a été réalisée. Les cellules mères de microspores et les grains de pollen à différents stades de développement ont été traités à l'orcéine afin d'observer leurs chromosomes (Dyer, 1963). Une coloration au Lugol, effectuée en parallèle, a permis de visualiser l'accumulation d'amidon dans les grains de pollen, signe de leur viabilité ainsi que de son hydrolyse débutant 2 jours avant l'anthèse (Nettancourt and Dijkstra, 1969).

Les observations microscopiques des cellules mères de pollen au stade de la métaphase II de la méiose (Fig. 9- A et B) et au stade tétrade (Fig. 9- C et D) ne démontrent aucune différence entre le témoin type sauvage et la lignée mutante *Scfrkl* S1. De plus, dans les deux lignées, les jeunes microspores mononucléés semblent également identiques (Fig. 9- E et F). Cependant, plus la gamétogenèse avance et plus des différences significatives entre les lignées s'affichent, ce qui suggère que le défaut se produit tardivement. En effet, aux stades avancés du développement, la plupart des microspores de la lignée *Scfrkl* S1 apparaissent vides et moins de 20% d'entre eux ont amorcé la première mitose. Le développement d'à peine 1% des microspores continue jusqu'à la différenciation

des noyaux génératif et végétatif (Fig. 9- I). À l’opposé, les microspores de la lignée ScG4 traversent normalement les étapes de mitose et de différenciation nucléaire (Fig. 9- G).

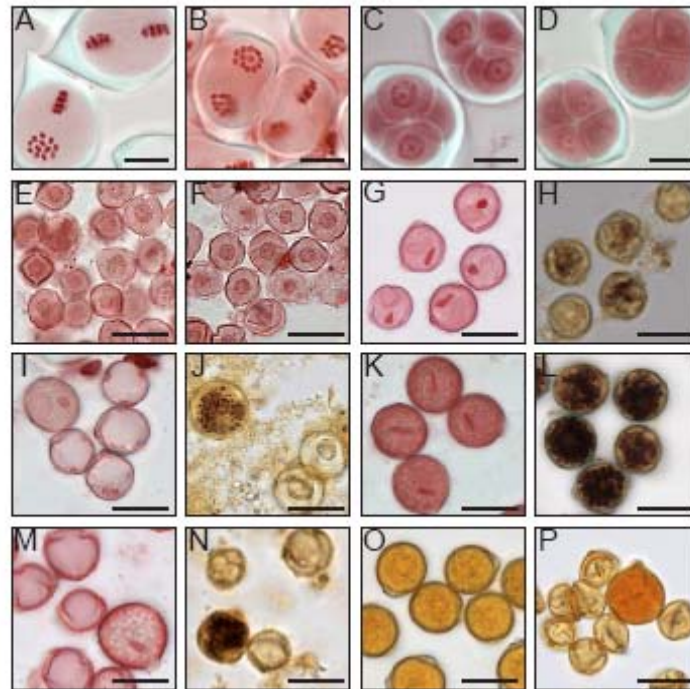
La microsporogénèse chez *S. chacoense* est très similaire et peut facilement se comparer à celle observée chez la tomate (Nettancourt and Eriksson, 1968) et chez *S. verrucosum* (Nettancourt and Dijkstra, 1969). Pour ces deux espèces, la première mitose s’accompagne rapidement d’une accumulation d’amidon. L’hydrolyse du sucre ne débute que deux jours avant l’ouverture de la fleur pour se compléter à l’anthèse. Lors des colorations au Lugol, nous avons remarqué que la totalité du jeune pollen témoin commence à accumuler de l’amidon immédiatement après la mitose (Fig. 9- H) pour atteindre un maximum environ trois jours avant l’anthèse. À ce moment, les grains de pollen prennent une teinte très foncée (Fig. 9- L). Dans les colorations à l’orcéine, le noyau végétatif est complètement caché par les grains d’amidon et seul le noyau génératif demeure visible (Fig. 9- K). Pour leur part, seulement 1% des grains de pollen de la lignée *Scfrk1* S1 emmagasinent l’amidon (Fig. 9- J), à savoir dans ceux où la mitose avait été complétée et suivie de la différenciation des noyaux génératif et végétatif. Le développement de ces grains de pollen s’est poursuivi semblablement à celui du témoin ScG4 (Fig. 9- M et N). À l’anthèse, presque tous les grains de pollen matures de la lignée témoin étaient viables, ayant achevés l’hydrolyse de l’amidon, et seule une faible proportion se colore en présence d’iode (Fig. 9- O). Dans la lignée *Scfrk1* S1, cependant, plus de 99 % des grains de pollen semblent recroquevillés et très peu d’entre eux présentent une apparence semblable à la normale. L’état de ces grains de pollen et l’absence de colorabilité en présence d’iode résultent de leur arrêt de développement avant que ne se déroule la mitose, leur empêchant à la fois l’accumulation et la dégradation du sucre (Fig. 9- P).

3.2.2.2 Microscopie en contraste interférentiel différentiel (DIC)

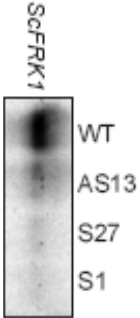
Les différentes plantes transgéniques à l’étude contiennent une faible proportion de graines, indiquant que la fécondation a tout de même lieu. La figure 7 indique que le

transcrit, quoique très faible, peut être responsable de la formation de quelques sacs embryonnaires permettant l'attraction de tubes polliniques et ainsi la formation d'un nombre réduit de graines. Il avait été noté que le mutant *Scfrk1* S1 montrait l'expression de *ScFRK1* la plus faible. De plus, il possédait les plus petits fruits et le moins d'embryons (Kapfer, 2003). Pour ces raisons, ce mutant a été utilisé pour observer les effets de la mutation de la protéine ScFRK1.

Figure 9 : Viabilité des grains de pollen chez *S. chacoense* à différents stades de développement par des colorations à l'orcéine (A, B, C, D, E, F, G, I, K et M) et au Lugol (H, J, L, N, O et P). A-B Stade de la Métaphase II de la méiose chez ScG4 (A) et *Scfrk1* S1 (B). C-D Stade tétrade chez ScG4 (C) et *Scfrk1* S1 (D). E-F Jeunes microspores mononucléées chez ScG4 (E) et *Scfrk1* S1 (F). G-J Stade de la première mitose chez ScG4 (G-H) *Scfrk1* S1 (I-J). K-N Accumulation d'amidon dans le pollen mature 3 jours avant l'anthèse chez ScG4 (K-L) et *Scfrk1* S1 (M-N). O-P Hydrolyse de l'amidon et apparence du pollen mature à l'anthèse chez ScG4 (O) et *Scfrk1* S1 (P). Échelle 20 µm.



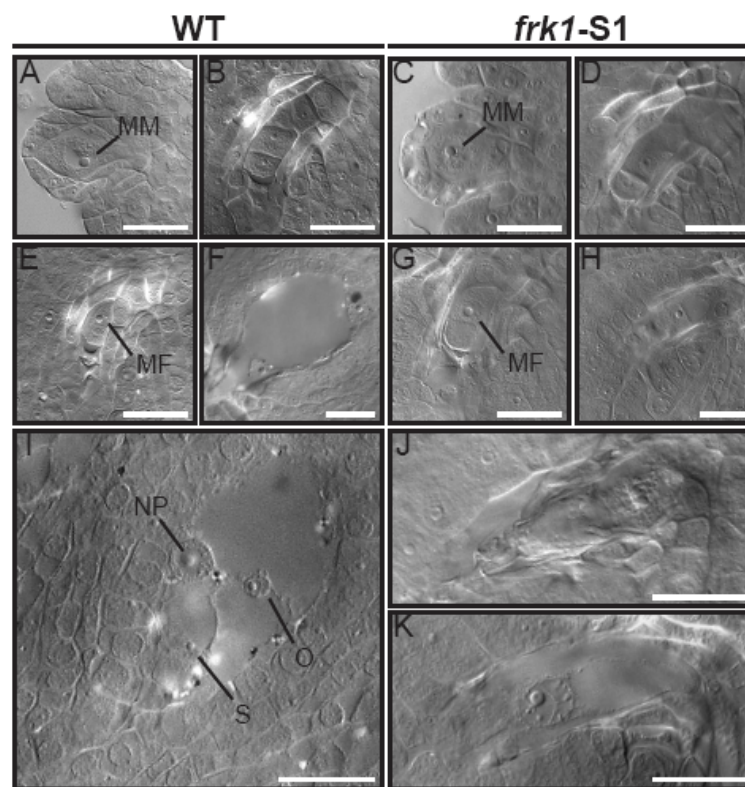
Nous savons que le gène s'exprime avant et après l'anthèse (Fig. 6) et que les niveaux d'expression sont influencés à la fois par la pollinisation et la fécondation. La formation de fruits contenant un très faible nombre de graines peut alors être le résultat d'un développement anormal des ovules ou de leur avortement post-fécondation. Afin de vérifier ces hypothèses, des ovules éclaircis graduellement au salicylate de méthyle ont été observés à l'anthèse avant pollinisation. Les résultats obtenus concordent avec les observations antérieures (Tab. II). En effet, on remarque que le pourcentage de sacs embryonnaires normaux est nul dans les lignées mutantes fortement affectées comme *Scfrk1* S1 (pour n=100 sacs observés). Cependant, lorsqu'un sac embryonnaire est visible chez le mutant, celui-ci est généralement dépourvu des cellules qui y sont normalement retrouvées, généralement les cellules micropylaires. Le sac embryonnaire est caractérisé de « modifié » lorsqu'il présente un nombre inférieur de cellules que le type sauvage. De faibles niveaux de transcrits du gène *ScFRK1* entraînent donc une diminution significative du nombre de sacs embryonnaires normaux observés.



Lignée	Pourcentage (%)		
	SE normal	SE modifié	SE absent
ScG4	96	4	0
<i>Scfrk1</i> AS13	44	30	26
<i>Scfrk1</i> S27	32	22	46
<i>Scfrk1</i> S1	0	6	94

Tableau II : Pourcentage de sacs embryonnaires (SE) normaux vs anormaux dans les différentes lignées de plantes transgéniques *Sfrk1* à l'anthèse. Pour chaque lignée, 100 ovules ont été observés. Un SE est considéré normal lorsque les cellules à la zone micropylaire (oosphère et les deux synergides adjacentes) sont observées sans ambiguïté. Un SE modifié représente un sac embryonnaire vide ou possédant un nombre inférieur de cellules que le type sauvage. L'absence de SE se caractérise par la présence de cellules sporophytiques à l'emplacement normalement occupé par le sac embryonnaire. Le SE semble alors totalement collapsé et ressemble à une mince fente. Un SE modifié ou absent est considéré comme anormal. L'analyse d'expression du gène *ScFRK1* à gauche du tableau est tirée de la figure 7.

Figure 10 : Développement du gamétophyte femelle chez *S. chacoense* au cours de la mégasporogénèse et de la mégagamétogénèse. A et C Mégaspore mère (MM) avant méiose. **B et D** Stade tétrade. **E et G** Différentiation de la mégaspore fonctionnelle (MF). La dégénérescence des trois autres mégaspores est visible en dessous de cette dernière, au niveau de la zone micropylaire. **F et H** Stade binucléé. **I, J et K** Sac embryonnaire mature à un stade ultérieur au mégagamétophyte octanucléé. J et K représentent le mutant. Les noyaux polaires sont alors fusionnés en une cellule centrale binucléée et les antipodales sont dégénérées. NP : Noyau polaire. S : Synergide. O : Oosphère. Échelle 20 μ m.



La formation du sac embryonnaire est une étape qui se déroule très tôt dans le développement de l'ovule. Pour déterminer le moment de formation de ce dernier, nous avons visualisé des ovules de bourgeons floraux du témoin ScG4 correspondant à différents stades de développement avant l'anthèse. L'anthèse correspond au moment d'éclosion des fleurs ou le temps zéro. Cette même technique a été utilisée avec des ovules du mutant *Scfrk1* S1 afin de déterminer à quel moment le défaut responsable du phénotype d'absence

ou de réduction de graines apparaît au cours du développement du gamétophyte femelle. Les observations par microscopie DIC montre que la formation du sac embryonnaire, ou mégasporogénèse, débute dans les ovules des bourgeons floraux mesurant ~2 mm (Tab. I). Le développement est identique chez le mutant jusqu'au stade où apparaît la mégaspore fonctionnelle (Fig. 10- A à D). La division de cette dernière n'est cependant pas observée chez le mutant *Scfrkl* S1 et seule cette cellule est visible aux stades multinucléés ultérieurs (Fig. 10- E à K).

Ces observations révèlent ainsi que la mégasporogénèse n'est pas affectée dans les lignées mutantes, mais que le développement du sac embryonnaire semble bloqué suite à la différenciation de la mégaspore fonctionnelle. Il en résulte généralement un sac embryonnaire rempli et fortement rétréci, dépourvu ou contenant une seule cellule en son centre (Fig. 10- J et K). La mutation de *ScFRKI* affecte donc la formation du sac embryonnaire au premier stade de la mégagamétogénèse et, du même coup, les étapes qui y sont reliées.

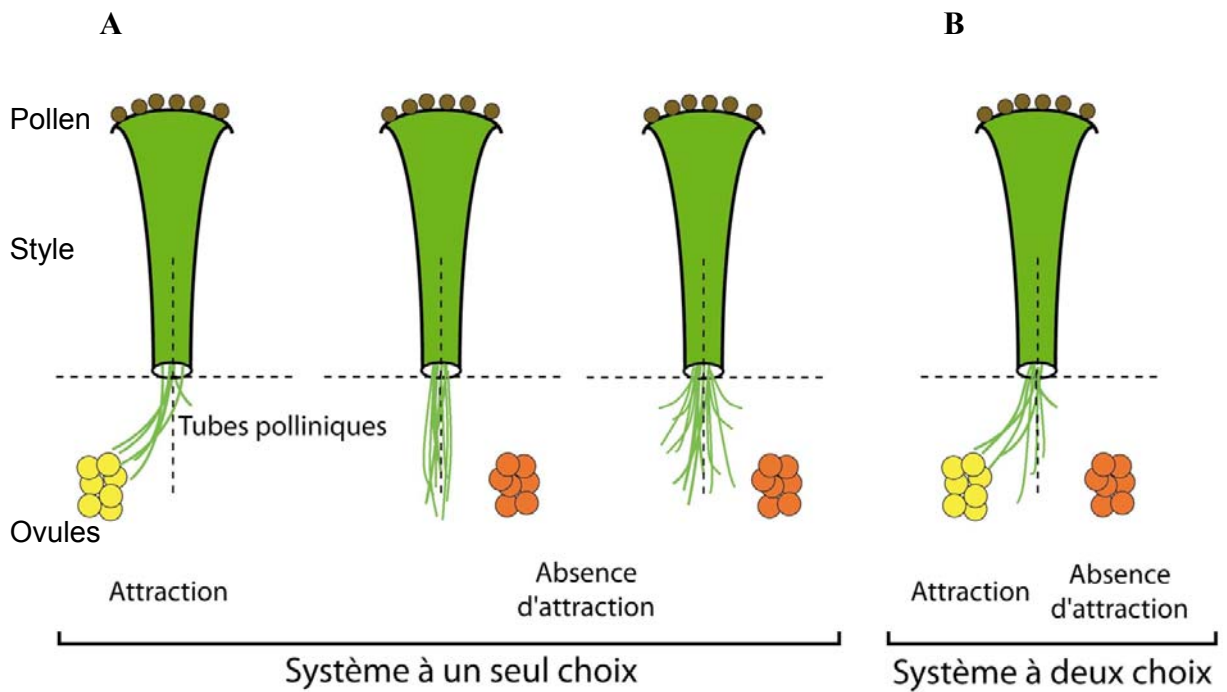
3.3 Guidage des tubes polliniques

Puisque le développement du sac embryonnaire dans la lignée *Scfrkl* S1 semble problématique, nous voulions déterminer quel serait l'impact de ce défaut sur le guidage des tubes polliniques sachant que leur guidage directionnel requière un sac embryonnaire fonctionnel (Ray et al., 1997). Pour ce faire, un système semi-*in vivo* a été mis au point (Fig. 11). Dans ce système, les fleurs sont pollinisées avec le pollen transgénique compatible puis elles demeurent 24 h dans les serres. Le style est alors prélevé et placé sur une gélose contenant un milieu de culture permettant la croissance des tubes polliniques. Avant que les tubes polliniques n'émergent du style, des ovules sont placés sur la gélose à ~0,7 mm de la sortie du style. L'émergence des tubes débute ~28 h AP et l'attraction est déterminée vers la (système à un seul choix) ou les cibles (système à deux choix) après 40 à

48 h. Par la suite, ce même système a été utilisé pour déterminer à quel stade de développement l'ovule acquière la capacité d'attirer les tubes polliniques. Différents types d'ovules ou différentes combinaisons d'ovules ont été également testés pour déterminer la spécificité ou la nature du signal émis.

Les pourcentages d'attraction vers les ovules testés dans un système à un seul choix ou vers les ovules ScG4 lors des essais d'ovules en compétition sont représentés sur le graphique récapitulatif à la figure 14. Seuls certains essais sont appuyés par une photographie et, pour chacun des cas, elle représente le résultat le plus fréquemment observé.

Figure 11 : Représentation schématique du système semi-*in vivo* en présence d'un seul type d'ovules (A) ou d'ovules mis en compétition (B). Le pollen fluorescent utilisé pour les pollinisations provient d'une plante exprimant la GFP sous le contrôle d'un promoteur pollen-spécifique (Lat52:GFP).



3.3.1 Le guidage est-il affecté chez le mutant *Scfrk1* S1?

Les essais en présence d'ovules de la lignée mutante *Scfrk1* S1 et de la plante SP10 montrent que la proportion de tubes polliniques qui tournent en direction de ces ovules est significativement inférieure à la proportion qui tourne vers les ovules de type sauvage ScG4 (Tab. III- A). SP10 est une plante mâle stérile et femelle quasi stérile issue d'une autopollinisation forcée de Sc582 (Luu et al., 2001). Le guidage semble donc fortement affecté chez ces plantes caractérisés par l'absence, une forte réduction en nombre ou une anomalie du sac embryonnaire, tel que démontré pour SP10 par Théo Stafford-Richard, un étudiant au laboratoire de recherche de D.P. Matton. Il est important de mentionner que, même en présence d'ovules de type sauvage, ce ne sont pas 100% des essais qui démontrent une attraction claire. En fait, un bruit de fond où aucune attraction n'est mesurée est présent dans tous les essais. Ce problème a aussi été noté dans d'autres études et nous y reviendrons lors de la discussion.

A	Essai	Ovules	Attractions / essais totaux	%	χ^2	p
	Contrôle	<i>S. chacoense</i> G4	47/80	59		
	Ovules testés	Mutant <i>Scfrk1</i> S1	6/60	10	38,29	< 0,0001
		SP10	4/48	8	36,15	< 0,0001

B	Essai	Ovules	Attraction vers G4 vs vers mutant	Test de proportion	p
	Ovules testés	<i>S. chacoense</i> G4 vs mutant <i>Scfrk1</i> S1	54 vs 111	0,5	< 0,000 ¹
		<i>S. chacoense</i> G4 vs SP10	45 vs 8	0,5	< 0,000 ¹

Tableau III : Guidage des tubes polliniques en présence d'ovules des lignées *Scfrk1* S1 et SP10. **A** Tableau de statistique de khi carré (χ^2) selon une comparaison entre 2 essais différents de système à un seul choix. **B** Tableau de probabilité (p). Test binomial d'attraction des tubes polliniques dans un système à deux choix. ¹ Signification asymptotique (bilatérale).

Lorsque mis en compétition dans un système à deux choix, les tubes polliniques se dirigent dans une proportion de cinq pour un vers les ovules de type sauvage lorsque comparés aux ovules de type mutant. Ce résultat est aussi hautement significatif (test binomial) et confirme les résultats obtenus dans le système à un seul choix (Tab. III- B). Deux hypothèses statistiques peuvent s'appliquer à ce test. La première, l'hypothèse nulle ou H_0 , est une hypothèse qui postule qu'il n'y a pas de différence entre les fréquences des deux choix. La seconde, l'hypothèse alternative ou H_1 , correspond à l'hypothèse de notre recherche. Contrairement à l'hypothèse nulle, notre hypothèse H_1 postule que la fréquence des choix s'écarte significativement du hasard. Comme il n'y a que deux choix, la fréquence de chacun est fixée à 0,5.

3.3.2 La pollinisation et la fécondation affectent-elles le guidage?

Puisque les tubes polliniques n'émergent du style qu'après 28 h suivant la pollinisation (tant *in vivo* que dans notre système semi-*in vivo*), il est possible que la capacité d'attraction soit induite par la pollinisation et/ou la croissance des tubes polliniques dans le style. De façon à tester cette hypothèse nous avons comparé le pouvoir d'attraction d'ovules provenant de pistils pollinisés depuis 24 h avec des ovules à l'anthèse. Les résultats obtenus démontrent que le taux d'attraction d'ovules de pistils pollinisés depuis 24 h (ScG4 24 h AP) n'est pas significativement différent de celui d'ovules non pollinisés pris à l'anthèse (Tab. IV- A). Par contre, lorsque le test d'attraction est effectué avec des ovules ayant été fécondés (ScG4 48-72 h AP), la proportion de tubes polliniques qui tournent en direction de ces ovules chute drastiquement et est significativement inférieure à la proportion qui tournent vers ScG4 (Tab. IV- A). Dans le système à deux choix, lors de la compétition entre les ovules du contrôle ScG4, nous remarquons qu'il n'y a pas de préférence vers les ovules type sauvage à l'anthèse versus les ovules type sauvage provenant de pistils pollinisés depuis 24 h (Tab. IV- B). Par contre, lorsque mis en compétition dans un système à deux choix, les tubes polliniques se dirigent dans une

proportion d'environ six pour un vers les ovules de type sauvage non fécondés lorsque comparés aux ovules fécondés (Tab. IV- B). Ce résultat est hautement significatif (test binomial) et les résultats obtenus dans le système à deux choix confirment ceux du système à un seul choix (Tab. IV- A).

A	Essai	Ovules	Attractions / essais totaux	%	χ^2	p
	Contrôle	<i>S. chacoense</i> G4	47/80	59		
	Ovules testés	<i>S. chacoense</i> G4 24 h AP	20/37	54	0,227	0,6335
		<i>S. chacoense</i> G4 48-72 h AP	6/64	9	41,213	< 0,0001

B	Essai	Ovules	Attraction vers G4 vs G4 \geq 24 HAP	Test de proportion	p
	Ovules testés	<i>S. chacoense</i> G4 vs G4 24 h AP	8 vs 5	0,5	0,581 ¹
		<i>S. chacoense</i> G4 vs G4 48-72 h AP	44 vs 7	0,5	0,000 ²

Tableau IV : Guidage des tubes polliniques lors des essais d'inductibilité. **A** Tableau de statistique de khi carré (χ^2) selon une comparaison entre 2 essais différents de système à un seul choix. **B** Tableau de probabilité (p). Test binomial d'attraction des tubes polliniques dans un système à deux choix.¹ Signification exacte (bilatérale); ² Signification asymptotique (bilatérale).

3.3.3 Acquisition de la compétence d'attraction

Parce que les ovules provenant de fleurs pollinisées ne démontrent pas un pouvoir d'attraction supérieur aux ovules collectés à l'anthèse, l'acquisition de la compétence doit nécessairement être régulée de façon développementale. Les essais selon le stade de développement montrent que la proportion de tubes polliniques qui tournent en direction des ovules ScG4 -2 j, ScG4 -1 j et ScG4 +4 j après anthèse est significativement inférieure à la proportion de tubes polliniques qui tournent vers le contrôle, alors que le guidage est semblable en présence d'ovules ScG4 +2 j (Tab. V- A). Les essais de compétition en fonction du stade de développements dans le système à deux choix corroborent

parfaitement avec ceux obtenus lors des tests à un seul choix, sauf pour les ovules ScG4 -2 j dont le résultat est non significatif pour cause d'échantillonnage trop faible (Tab. V- B). On remarque que tant dans le système à un choix qu'à deux choix, les ovules ScG4 -1 j et ScG4 +4 j n'attirent peu ou pas les tubes polliniques alors qu'avec les ovules ScG4 +2 j, le résultat obtenu n'est pas statistiquement différent de celui obtenu avec des ovules à l'anthèse. Ainsi, ces ovules ont toujours une entière capacité de guidage.

A	Essai	Ovules	Attractions/ essais totaux	%	χ^2	p
	Contrôle	<i>S. chacoense</i> G4	47/80	59		
	Ovules testés	<i>S. chacoense</i> G4 -2 j	4/22	18	12,099	0,0005
		<i>S. chacoense</i> G4 -1 j	9 /47	19	19,935	< 0,0001
		<i>S. chacoense</i> G4 +2 j	32 /47	68	1,109	0,2922
		<i>S. chacoense</i> G4 +4 j	4/25	16	15,051	0,0001

B	Essai	Ovules	Attraction vers G4 vs G4 -2 j → +4 j	Test de proportion	p
	Ovules testés	<i>S. chacoense</i> G4 vs G4 -2 j	9 vs 3	0,5	0,146 ¹
		<i>S. chacoense</i> G4 vs G4 -1 j	26 vs 8	0,5	0,003 ²
		<i>S. chacoense</i> G4 vs G4 +2 j	14 vs 16	0,5	0,856 ²
		<i>S. chacoense</i> G4 vs G4 +4 j	11 vs 12	0,5	0,006 ¹

Tableau V : Guidage des tubes polliniques lors des essais sur les stades de développement (j : jours après anthèse). A Tableau de statistique de khi carré (χ^2) selon une comparaison entre 2 essais différents de système à un seul choix. B Tableau de probabilité (p). Test binomial d'attraction des tubes polliniques dans un système à deux choix. ¹ Signification exacte (bilatérale); ² Signification asymptotique (bilatérale).

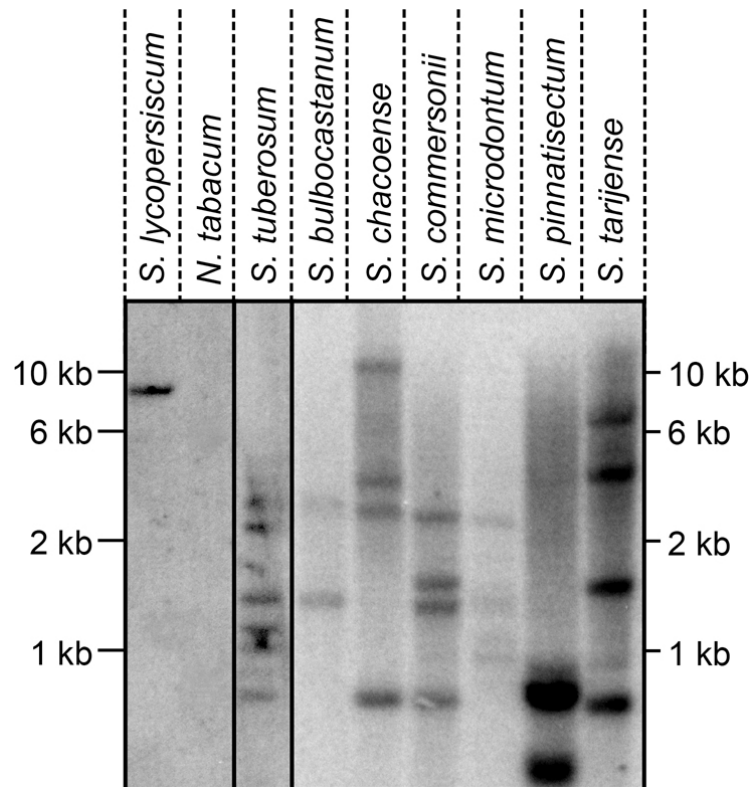
3.3.4 Spécificité du signal d'attraction

3.3.4.1 Sélection d'espèces apparentées à *S. chacoense* – « Garden blot »

Par une analyse de type Southern, le « Garden blot » a permis de déterminer si d'autres espèces végétales possèdent un gène similaire à *ScFRK1*. Nous savions que les

protéines kinases chez *A. thaliana* (MAPKKK 19, 20 et 21) ne partagent qu'environ 45% d'identité de séquence en acide aminé avec ScFRK1 (Fig. 4). Nous avons donc choisi différentes espèces plus ou moins rapprochées de *S. chacoense*, toutes des Solanacées du genre *Solanum*, sauf *Nicotiana tabacum* qui représente l'espèce hors groupe. La sonde utilisée correspond à l'ADNc de *ScFRK1* dans son intégrité et provenant initialement du plant contrôle Sc582.

Figure 12 : Détection du gène *ScFRK1* par « Garden blot ». Analyse de type Southern de *ScFRK1* dans différentes espèces végétales plus ou moins éloignées de *S. chacoense*.



Les études antérieures portant sur *ScFRK1* ont montré que sa séquence est exempte d'introns et qu'au moins trois copies du gène se retrouvent dans le génome de *S. chacoense* (Caron, 2002). À la figure 12, nous pouvons remarquer quatre bandes distinctes pour *S.*

chacoense : l'une mesurant ~10 kb, deux autres à ~5 kb et ~4 kb et une dernière en dessous de 1 kb. Certaines de ces bandes sont également présentes dans le patron d'autres espèces. La bande à ~10 kb est aussi visible chez *S. lycopersicum* (*L. esculentum*), espèce qui ne montre que cette bande. La bande à ~5 kb semble se retrouver chez *S. tarijense* et possiblement, mais très faiblement chez *S. tuberosum*. Plusieurs espèces affichent la bande à ~4 kb (*S. tuberosum*, *S. bulbocastanum*, *S. commersonii* et *S. microdontum*). Finalement la bande inférieure à 1 kb est discernable autant chez *S. tuberosum*, *S. commersonii*, *S. pinnatisectum* et *S. tarijense*. Hormis *S. chacoense*, d'autres espèces partagent aussi entre elles des bandes communes, plus particulièrement *S. bulbocastanum* (quelques bandes sont peu visibles), *S. commersonii* et *S. microdontum*.

3.3.4.2 Analyses phylogénétiques

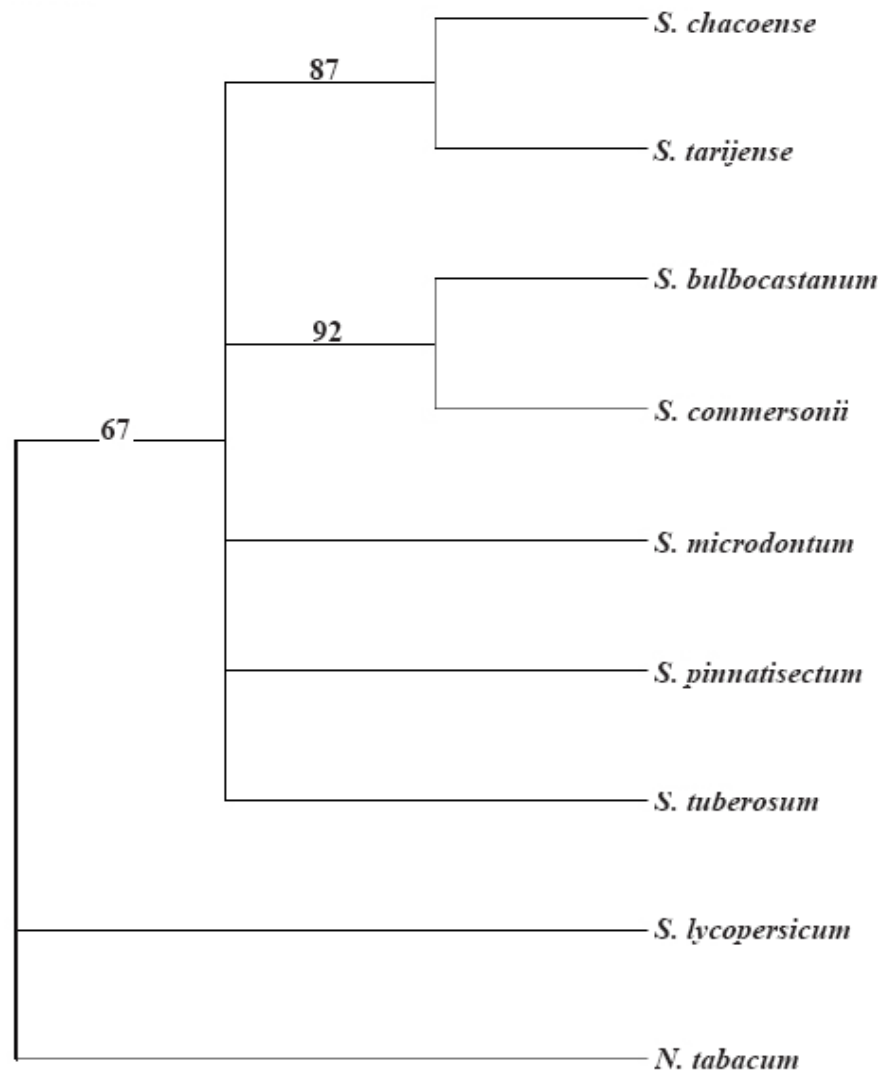
D'après les résultats obtenus par le « Garden blot » (Fig. 12), l'ADNg des espèces où la sonde *ScFRK1* s'est fixée a été amplifié avec les amorces correspondant à la séquence ITS. La matrice comprend les séquences d'ITS obtenues en laboratoire ainsi que les séquences de *S. commersonii* et *S. tarijense* provenant de Genbank. L'espèce *N. tabacum* a été utilisée comme extra groupe pour l'enracinement de l'arbre.

La matrice comprenait un total de 6,7% de caractères informatifs. Trois arbres ont été générés. Seul l'arbre de consensus strict est présenté avec les supports de branches qui ont été estimés avec 1000 répliquats de bootstrap en utilisant la méthode heuristique avec 1000 répliquats d'addition de séquences et du réarrangement de branches (TBR) (Fig. 13). L'arbre a une longueur de 301 pas avec un indice de congruence (CI « consistency index ») de 0.824 et un indice de rétention (RI) de 0.376.

L'association de certaines espèces dans l'arbre appuie les résultats obtenus au « Garden blot ». Lorsque des espèces partagent plus d'une bande entre elles, ces dernières semblent se regrouper phylogénétiquement. C'est le cas pour *S. chacoense*, *S. tarijense* et

S. commersonii. Toutes les espèces de pomme de terre sauvages utilisées dans cette phylogénie se regroupent entre elles. La tomate (*S. lycopersicum*) est pour sa part exclue de ce groupe, même si elle s'insère dans le même genre.

Figure 13 : Arbre phylogénétique des séquences ITS au sein de quelques espèces de Solanacées. L'analyse phylogénétique est basée sur la séquence ITS de différentes espèces de *Solanum*, mis à part *N. tabacum* qui représente l'espèce hors groupe. Les chiffres sont en pourcentage et donnent un indice de confiance du regroupement.



3.3.4.3 Guidage des tubes polliniques selon les espèces testées

Tout comme lors de l'utilisation d'ovules à l'anthèse vs des ovules ScG4 +2 j (voir point 3.3.3), nous observons que la proportion de tubes polliniques qui tournent en direction des ovules de la lignée ScV22 n'est pas significativement différente de celle qui tournent vers ScG4, quoique le pourcentage est inférieur lors de l'utilisation d'ovules ayant la même composition génétique que le pollen au niveau du locus S. Ceci suggère que l'expression des S-RNases au niveau de l'épiderme des ovules affecterait l'attraction micropylaire en provoquant probablement une réaction d'auto-incompatibilité partielle (Matton et al., 1998).

Comme prévu, à part l'influence possible du système d'auto-incompatibilité sur le guidage (dans le cas d'utilisation de pollen et d'ovules provenant d'un même génotype), aucune différence statistiquement significative n'est observée avec des ovules de la même espèce à l'anthèse ou dans les deux jours suivants l'anthèse. Par contre, en présence d'ovules provenant des sept différentes espèces de Solanacées du genre *Solanum*, la proportion de tubes polliniques qui tournent en direction de ces ovules est significativement inférieure à la proportion de tubes polliniques qui tournent vers ScG4 (Tab. VI- A). Ceci indique que l'attraction des tubes polliniques est hautement spécifique à l'espèce.

Lors des essais de compétition, au seuil classique de 5%, nous observons une préférence significative vers les ovules du contrôle ScG4 aux dépens de toutes les autres espèces étudiées quoique la valeur obtenue avec *S. tarijense* ne soit que faiblement significative, reflétant la parenté élevée entre *S. chacoense* et *S. tarijense* (Tab. VI- B). Les essais dans le système à deux choix corroborent donc entièrement ceux obtenus précédemment lors des tests à un seul choix.

A		Essai	Ovules	Attractions/ essais totaux	%	χ^2	p
		Contrôle	<i>S. chacoense</i> G4	47/80	59		
		Ovules testés	<i>S. chacoense</i> V22	16/37	43	2,448	0,1177
			<i>S. bulbocastanum</i> (S1)	12/55	22	18,857	< 0,0001
			<i>S. commersonii</i> (S4)	5/52	10	35,644	< 0,0001
			<i>S. microdontum</i> (S6)	8/71	11	39,622	< 0,0001
			<i>S. pinnatisectum</i> (S8)	6/43	14	24,962	< 0,0001
			<i>S. tarijense</i> (S12)	10/48	21	18,343	< 0,0001
			<i>S. tuberosum</i> (S9)	4/45	9	33,593	< 0,0001
			<i>S. lycopersicum</i> (tomate)	0/55	0	66,058	< 0,0001

B		Essai	Ovules	Attraction vers G4 vs ≠ spp.	Test de proportion	p
		Ovules testés	<i>S. chacoense</i> G4 vs <i>S. chacoense</i> V22	16 vs 7	0,5	0,093 ¹
			<i>S. chacoense</i> G4 vs <i>S. bulbocastanum</i> (S1)	25 vs 5	0,5	0,000 ²
			<i>S. chacoense</i> G4 vs <i>S. commersonii</i> (S4)	28 vs 5	0,5	0,000 ²
			<i>S. chacoense</i> G4 vs <i>S. microdontum</i> (S6)	49 vs 5	0,5	0,000 ²
			<i>S. chacoense</i> G4 vs <i>S. pinnatisectum</i> (S8)	29 vs 5	0,5	0,000 ²
			<i>S. chacoense</i> G4 vs <i>S. tarijense</i> (S12S13)*	44 vs 24	0,5	0,021 ²
			<i>S. chacoense</i> G4 vs <i>S. tuberosum</i> (S9)	25 vs 5	0,5	0,000 ²
			<i>S. chacoense</i> G4 vs <i>S. lycopersicum</i>	28 vs 4	0,5	0,000 ²

Tableau VI : Guidage des tubes polliniques lors des essais avec les différentes espèces de *Solanum*. A Tableau de statistique de khi carré (χ^2) selon une comparaison entre 2 essais différents de système à un seul choix. B Tableau de probabilité (p). Test binomial d'attraction des tubes polliniques dans un système à deux choix. ¹ Signification exacte (bilatérale); ² Signification asymptotique (bilatérale); * Résultats combinés avec deux accessions différentes de *S. tarijense* nommées arbitrairement S12 et S13.

3.3.5 Nature protéique du ligand

La très haute spécificité à l'espèce obtenue lors de l'expérience précédente suggère que la nature du signal est hautement polymorphe. Dans la présente expérience, l'utilisation d'ovules bouillis dans le système semi-*in vivo* avait pour but de déterminer si l'attractant est de nature protéique. Une absence d'attraction serait alors un indice puisque les protéines ne sont pas thermorésistantes.

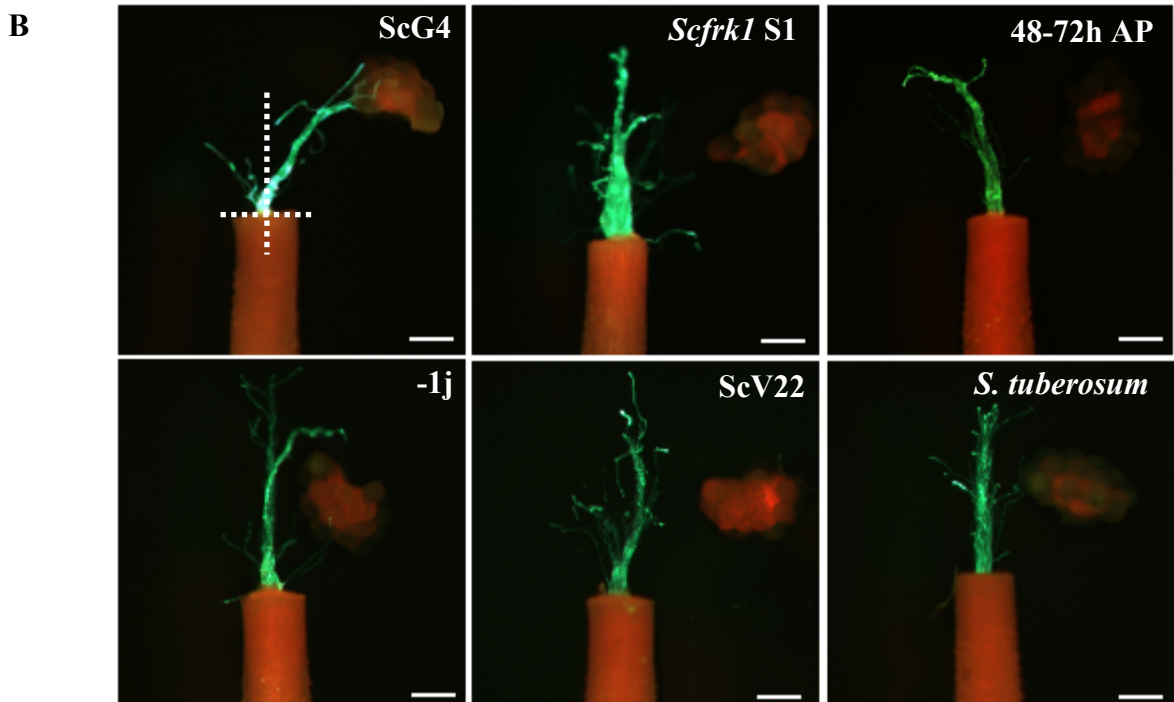
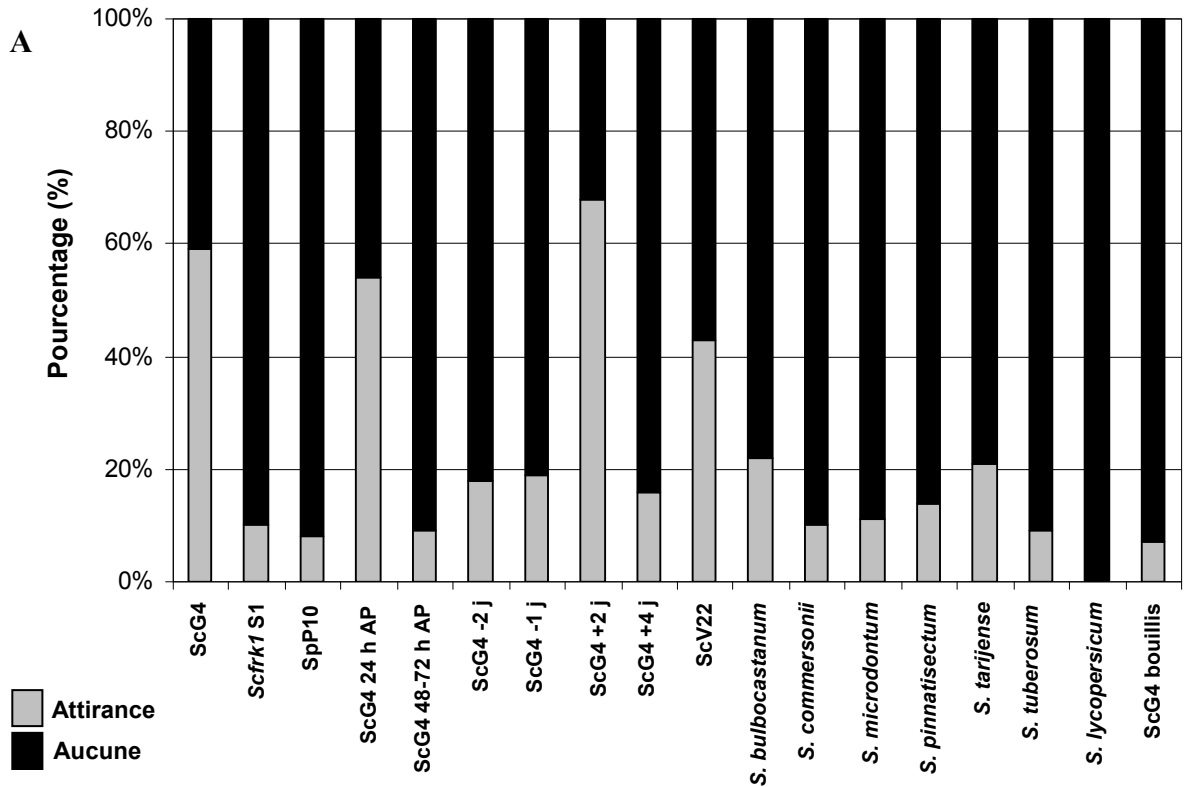
Nous avons observé que la proportion de tubes polliniques qui tournent en direction des ovules bouillis est significativement inférieure à la proportion de tubes polliniques qui tourne vers ScG4. (Tab. VII- A). Il en va de même pour les essais de compétition qui démontrent aussi qu'il existe une préférence significative vers les ovules intacts du contrôle ScG4 vs les ovules bouillis (Tab. VII- B). Par contre, lorsque l'on compare des ovules provenant du mutant *Scfrk1* S1 avec des ovules ScG4 bouillis, la différence obtenue n'est pas statistiquement supportée, indiquant que dans les deux cas, ces ovules sont rendus presque incapables à guider les tubes polliniques.

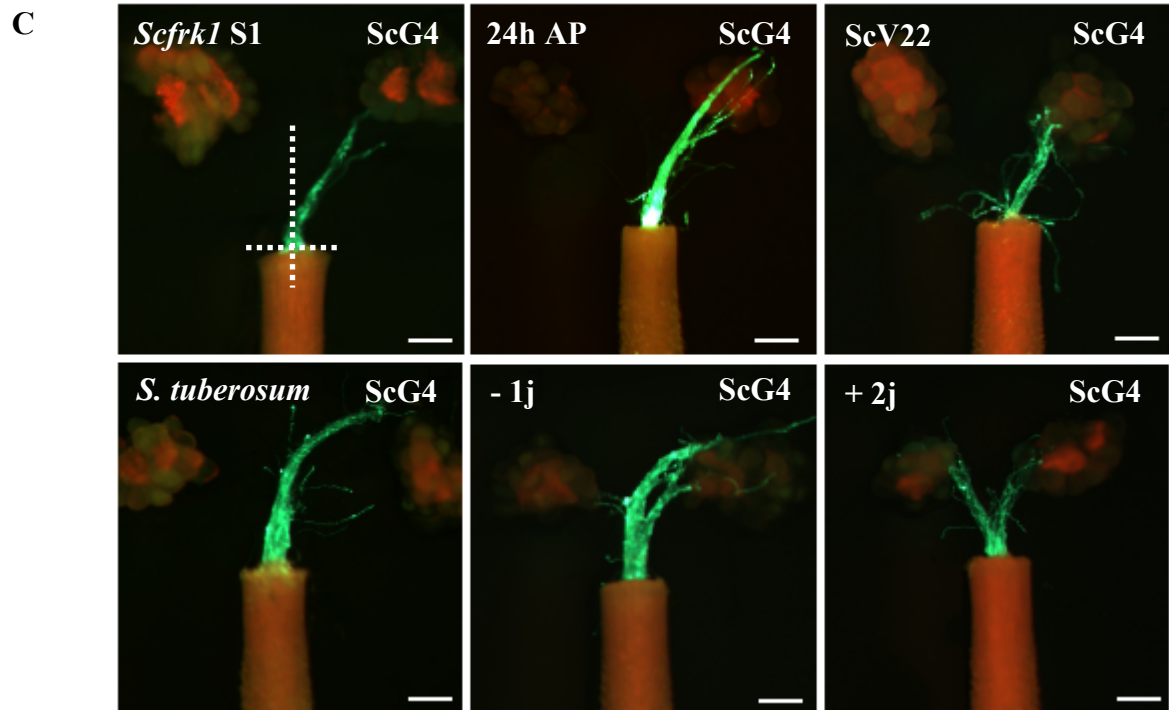
A	Essai	Ovules testés	Attractions/ essais totaux	%	χ^2	p
	Contrôle	<i>S. chacoense</i> G4	47/80	59		
	Ovules testés	<i>S. chacoense</i> G4 bouillis	6/81	7	52,804	< 0,0001

B	Essai	Ovules testés	Attractions vers G4 vs essais	Test de proportion	p
	Ovules testés	<i>S. chacoense</i> G4 vs G4 bouillis	36 vs 66	0,5	0,000 ¹
		Mutant <i>Scfrk1</i> S1 vs G4 bouillis	30 vs 20	0,5	0,203 ¹

Tableau VII : Guidage des tubes polliniques lors des essais portant sur la nature protéique du ligand. **A** Tableau de statistique de khi carré (χ^2) selon une comparaison entre 2 essais différents de système à un seul choix. **B** Tableau de probabilité (p). Test binomial d'attrance des tubes polliniques dans un système à deux choix. ¹ Signification asymptotique (bilatérale).

Figure 14 : Guidage des tubes polliniques dans un système semi-*in vivo* en présence d'ovules positionnés à ~0,7 mm de l'extrémité du style ScG4. **A** Graphique récapitulatif des différents essais. Les pourcentages d'attraction représentent les attractions vers les ovules testés par rapport au nombre total d'essais effectués. La différence donne les pourcentages d'aucune attraction. **B** Résultats représentatifs de certains essais de guidage dans le système à un seul choix. **C** Résultats représentatifs de certains essais de guidage dans le système à deux choix. Échelle 1000 μ m.





3.4 Croisements entre différentes espèces de *Solanum*

L'acquisition des différentes espèces rapprochées de *S. chacoense* avait pour but premier de servir aux essais de guidage des tubes polliniques. Cependant, leur présence a été également utile pour des tests de compatibilité intra et interspécifique. Initialement, pour chacune des espèces, nous avons procédé à leur autopollinisation. De cette manière, nous avons obtenus des fruits uniquement pour les géotypes S8 de *S. pinnatisectum* et S10 de *S. tuberosum*, cette dernière espèce étant tétraploïde. Ce résultat s'explique difficilement pour *S. pinnatisectum*, supposé être diploïde, à moins que cette accession ne présente une forme complète ou partielle d'auto-compatibilité.

Dans le cas des pollinisations intraspécifiques entre deux accessions différentes d'une même espèce, chaque croisement a abouti à la formation d'un fruit, indiquant par le fait même que ces accessions ne partageaient pas des allèles identiques d'auto-

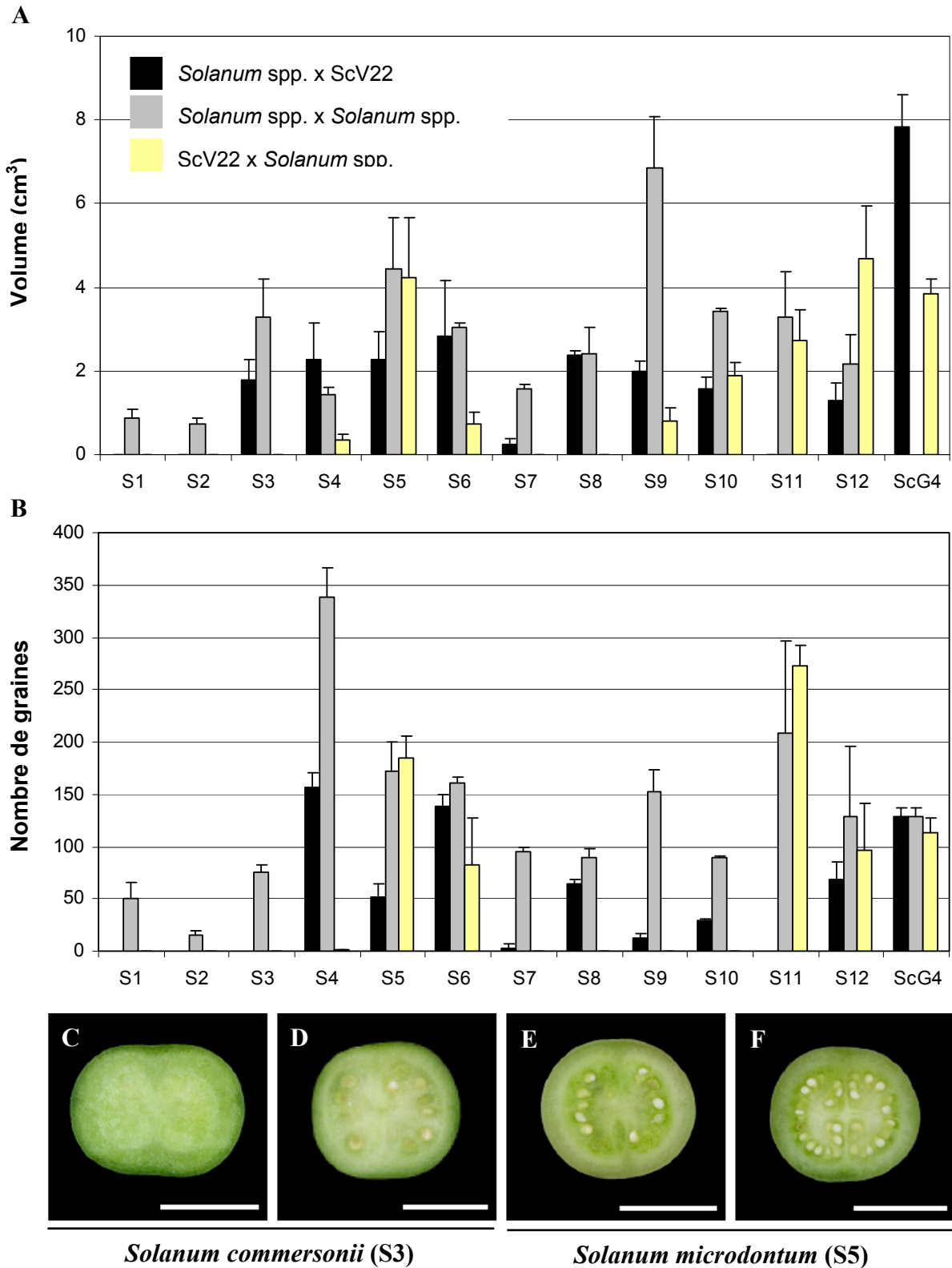
incompatibilité. Le compte des graines de ces fruits est alors maximal et les fruits ainsi obtenus peuvent servir en comparaison avec ceux des croisements interspécifiques, c'est-à-dire entre le génotype ScV22 de *S. chacoense* et chacune des autres espèces à l'étude. En effet, les observations diffèrent dans ce type de croisement. Lors du croisement des plants de *Solanum* spp. par le pollen de ScV22, nous avons noté l'absence de fruit pour les deux génotypes de *S. bulbocastanum* (S1 et S2) ainsi que pour le génotype S11 de *S. tarijense*. De plus, lorsqu'un fruit est présent, il est généralement de taille réduite comparativement aux fruits des croisements intraspécifiques. Pour ScG4, afin de s'assurer un croisement compatible, le croisement intraspécifique s'est fait avec le pollen ScG4 sur des plants ScV22 (Fig. 15- A). Aussi, le nombre de graines est habituellement plus élevé dans les fruits issus d'un croisement intraspécifique (Fig 15- B et C à F). Dans le cas des croisements interspécifiques, seuls les graines viables ont été calculées. Il était fréquent d'en retrouver de très minuscules, rendant ainsi le compte impossible, comme par exemple pour le génotype S3 de *S. commersonii* (Fig 15- C).

Après avoir mesuré leur diamètre et compté leur nombre de graines respectif, seul les fruits provenant des croisements *Solanum* spp. x ScV22 ont été disséqués. Ceci a permis de libérer les graines afin de procéder à leur germination *in vitro* (Tab. VIII). Une germination a été observée sur les deux génotypes de *S. commersonii* (S3 et S4), quoique, comme mentionné précédemment, la majorité des graines de S3 était minuscule, possiblement suite à un avortement ou une absence de fécondation. Une plantule a également été obtenue pour les deux génotypes de *S. tuberosum* (S9 et S10) de même que pour le génotype S12 de *S. tarijense*. Les génotypes S5 et S6 de *S. microdontum* ont montré la meilleure germination autant par la vitesse de croissance que l'aspect général de la plantule. Lors des pollinisations réciproques, c'est-à-dire en utilisant le pollen de chaque espèce de *Solanum* sur les plants de ScV22, nous avons obtenus des croisements incompatibles avec les deux génotypes de *S. bulbocastanum* (S1 et S2) et de *S.*

pinnatisectum (S7 et S8). Il en a été de même avec le génotype S3 de *S. commersonii* (Fig. 15).

Pour s'assurer de la stérilité des croisements incompatibles obtenus, la viabilité des grains de pollen des différentes espèces a été confirmée par des colorations au carmin acétique. Puisque le pollen semble viable dans chacune des lignées à l'étude, le problème rencontré pourrait s'expliquer davantage par l'incapacité de la majorité des tubes polliniques à se rendre aux ovules. Pour visualiser ce phénomène, des fleurs ont été récoltées 24 h ou 48 h AP pour chaque croisement testé. Après un traitement au NaOH, les styles des fleurs ont été colorés au bleu d'aniline et observés sous UV. Ceci a permis de mesurer la longueur à la fois des styles et des tubes polliniques qui s'y trouvent afin de reporter ces mesures sous forme de proportions (Fig. 16). Dans chacun des cas, l'hydratation (classification 1) et la germination (classification 2) des grains de pollen se sont bien déroulées. Selon la distance parcourue à l'intérieur du style dans lequel ils se retrouvent, nous numérotions la croissance des tubes polliniques lorsqu'elle s'arrête à moins de 20% de la longueur du style (classification 3), quand elle se situe entre 20 et 40% de la longueur du style (classification 4), lorsqu'elle atteint 40 à 80% de la longueur du style (classification 5) ou finalement lorsque les tubes polliniques se trouvent à proximité ou pénètrent l'ovaire (classification 6). Nous pouvons considérer que dans ce dernier cas, le croisement est parfaitement compatible alors qu'une mesure semblable obtenue 48 h AP indique que la croissance des tubes polliniques est inhibée. Les résultats obtenus par coloration au bleu d'aniline concordent avec les différents croisements effectués précédemment.

Figure 15 : Analyses phénotypiques de croissance et de développement des fruits matures des croisements entre les différentes espèces de *Solanum* (S1 à S12) et le contrôle ScV22 30 jours AP. **A** Graphique du volume des fruits (cm³). **B** Graphique du nombre de graines moyen par fruit. **C-F** Phénotype au niveau des fruits d'un croisement interspécifique entre *Solanum* spp. et le pollen ScV22 (C et E) ou d'un croisement intraspécifique (D et F). Fruits 1 mois AP. Échelle 1 cm.

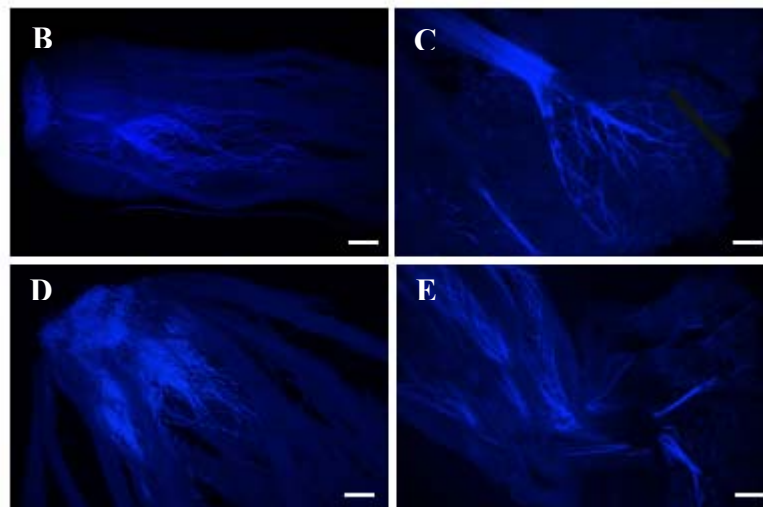


Pollen (♂) Fleur (♀)		<i>S. chacoense</i>		<i>S. bulbocastanum</i>		<i>S. commersonii</i>		<i>S. microdontum</i>		<i>S. pinnatisectum</i>		<i>S. tuberosum</i>		<i>S. tarijense</i>	
		V22	G4	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
<i>S. chacoense</i>	V22	Ø	F	Ø	Ø	Ø	F	F	F	Ø	Ø	F _{ga}	F _{ga}	F	F
	G4	F _{gv}	Ø												
<i>S. bulbocastanum</i>	S1	Ø		Ø	F										
	S2	Ø		F	Ø										
<i>S. commersonii</i>	S3	F _{ga}				Ø	F								
	S4	F _{gv}				F	Ø								
<i>S. microdontum</i>	S5	F _{gv}						Ø	F						
	S6	F _{gv}						F	Ø						
<i>S. pinnatisectum</i>	S7	F _{gnv}								Ø	F				
	S8	F _{gnv}								F	F				
<i>S. tuberosum</i>	S9	F _{gv}										Ø	F		
	S10	F _{gv}										F	F		
<i>S. tarijense</i>	S11	Ø												Ø	F
	S12	F _{gv}												F	Ø

Tableau VIII : Tableau récapitulatif des différents croisements intraspécifiques et interspécifiques. Lorsque présents, les indices s'appliquent uniquement aux graines des fruits dérivés des croisements *Solanum* spp. x ScV22. F : Formation d'un fruit. Ø : Aucun fruit. F_{ga} : Fruit avec graines avortées. F_{gv} : Fruit avec graines viables. F_{gnv} : Fruit avec graines non viables.

Figure 16 : Croisements interspécifiques. **A** Tableau de croissance des tubes polliniques à l'intérieur de style à la suite d'un croisement interspécifique 24 h ou 48 h AP. 1- Aucune hydratation des grains de pollen. 2- Aucune germination des grains de pollen. 3- Arrêt des tubes polliniques tôt dans le style (moins de 20% de la longueur du style). 4- Arrêt des tubes polliniques au quart de la longueur du style (entre 20-40% de la longueur du style). 5- Arrêt des tubes polliniques environ à la moitié de la longueur du style (entre 40-80% de la longueur du style). 6- Arrêt ou entrée des tubes polliniques à l'ovaire (entre 80-100% de la longueur du style). **B** Tubes polliniques de ScV22 à l'intérieur du style de *S. pinnatisectum* (S7) 24 h AP. **C** Tubes polliniques de ScV22 à l'intérieur du style de *S. tuberosum* (S10) 48 h AP. **D** Tubes polliniques de *S. bulbocastanum* (S2) à l'intérieur du style de ScV22 48 h AP. **E** Tubes polliniques de *S. microdontum* (S6) à l'intérieur du style de ScV22 48 h AP. Les styles pollinisés ont été colorés au bleu d'aniline à la suite d'un traitement au NaOH. Échelle 200 µm.

A	Pollen	Croissance – style Sc V22		Pollen	Croissance – style <i>Solanum</i> spp.	
		24 h AP	48 h AP		24 h AP	48 h AP
	<i>S. chacoense</i> G4	5	6	ScV22	5	6
	<i>S. bulbocastanum</i> S1	4	5	ScV22	4	4
	<i>S. bulbocastanum</i> S2	4	4	ScV22	3	3
	<i>S. commersonii</i> S3	5	5	ScV22	5	6
	<i>S. commersonii</i> S4	5	6	ScV22	6	6
	<i>S. microdontum</i> S5	6	6	ScV22	5	6
	<i>S. microdontum</i> S6	5	6	ScV22	5	6
	<i>S. pinnatisectum</i> S7	3	4	ScV22	4	6
	<i>S. pinnatisectum</i> S8	3	3	ScV22	4	6
	<i>S. tuberosum</i> S9	5	6	ScV22	5	6
	<i>S. tuberosum</i> S10	5	6	ScV22	4	6
	<i>S. tarijense</i> S11	5	6	ScV22	4	5
<i>S. tarijense</i> S12	6	6	ScV22	5	5	



3.5 Isolement du promoteur *ScFRK1*

La séquence promotrice *ScFRK1* a été obtenue par marche chromosomique (*genome walking*) à partir de la région 3' UTR du gène. Cette stratégie nous a permis de non seulement isoler le promoteur mais de comparer la séquence codante de *ScFRK1* obtenue initialement du génotype P1230582 (Sc582). Nous avons remarqué de légères différences entre la nouvelle séquence du gène et l'originale retrouvée dans la lignée Sc582. En effet, il existe quelques substitutions de bases, mais la différence majeure est la présence d'une base azotée thymine supplémentaire. Cet ajout modifie le cadre de lecture et crée un allèle à la première séquence de *ScFRK1*. L'hypothèse qu'une erreur de séquençage se soit glissée dans la séquence initiale de *ScFRK1* du génotype Sc582 peut être éliminée. En effet, la clarté de la séquence obtenue indique qu'il s'agirait davantage d'une ou de mutations lors de la création de la banque. L'alignement à la figure 17 présente la séquence originale de *ScFRK1* (*FRK1* P1230582), la séquence obtenue grâce aux amorces spécifiques à la région promotrice (*FRK1* G4) ainsi que la séquence dans le génotype Sc582 dérivée d'une amplification PCR réalisée pour confirmer la présence d'une variante allélique (*FRK1* P1230582 PCR).

L'acquisition de la séquence promotrice permet la création de diverses plantes transgéniques (Fig. 18 et 19), eux-mêmes essentiels à son analyse plus profonde. En effet, les différentes constructions de délétions de promoteur ont été obtenues par clonage directionnel de manière à exprimer le gène rapporteur GUS (Curtis and Grossniklaus, 2003). Ainsi, une coloration bleue nous indique spécifiquement l'expression spatiale de *ScFRK1*. Pour chacune des délétions testées, plusieurs plantules régénérées ont été cultivées en serres jusqu'à l'obtention de fleurs. Après la révélation de l'activité enzymatique GUS, nous avons observé une coloration bleue sur les ovaires de nombreux transgéniques. Ces données trop partielles ne sont cependant pas présentées dans ce présent travail.

Pour leur part, les constructions de complémentation à partir des mutants *Scfrk1* S1 n'ont pas fonctionné, malgré plusieurs essais. Ces constructions auraient permis de reconstituer le phénotype d'origine, soit le développement d'un sac embryonnaire fonctionnel à maturité. La transformation a donc été effectuée avec ScG4 afin de visualiser le phénomène de co-suppression. Après avoir mesuré le diamètre des fruits et calculé leur nombre de graines respectif, nous avons remarqué que plusieurs transgéniques différaient des valeurs du contrôle ScG4. Pour chacune des constructions de complémentation, au moins trois spécimens présentaient de plus petits fruits avec une réduction marquante en graines (Fig. 20). Seules les graines qui présentaient un aspect semblable au témoin type sauvage ont été prises en compte. Il était fréquent d'observer de minuscules graines ou quelques unes légèrement brunâtres, comme lors d'un avortement. Dans mon cas, l'analyse s'est arrêtée à cette étape et sera poursuivie par un autre étudiant. Les résultats présentés à la figure 20 ont tout de même démontré que des plantes transgéniques possédant le même défaut que le mutant *Scfrk* S1, soit la diminution drastique du nombre de graines par fruit, ont pu être produites de façon encore mieux ciblée, mais cette fois en utilisant le promoteur endogène de *ScFRK1* plutôt que le promoteur viral du virus de la mosaïque du chou fleur (CaMV 35S). Ces plantes présentant un niveau réduit en graine sont fort probablement aussi le résultat d'une co-suppression génique, tel qu'observé précédemment pour les lignées mutantes *Scfrk1* S1 et S27.

Figure 17 : Alignement des séquences protéiques de *ScFRK1* provenant des génotypes Sc582 et ScG4. Les carreaux gris représentent les acides aminés conservés. La première séquence retrouvée dans le génotype Sc582 est la séquence sur laquelle s'est initialement basé le projet de recherche. La seconde, du génotype ScG4, a été obtenue au cours de ce présent travail, alors que la troisième séquence provient d'une amplification PCR du génotype Sc582. La flèche noire représente la modification du cadre de lecture de la séquence retrouvée dans ScG4.

<i>FRK1</i> PI230582	1	M E K N Q E A E V M W K R G R T L G Q G G F G F V S L A C T	30
<i>FRK1</i> G4	1	M E K N Q E A E I M W K R G R T L G Q G G F G F V S L A C T	30
<i>FRK1</i> PI230582 PCR	1	M E K N Q E A E V M W K R G R T L G Q G G F G F V S L A C T	7
<i>FRK1</i> PI230582	31	T H S D D S P L I P S L I A V K S C M L S H S E S L E D E I	60
<i>FRK1</i> G4	31	T H S D D S P L I P S L I A V K S C M L S H S E S L E D E I	60
<i>FRK1</i> PI230582 PCR	8	T H S D D S P L I P S L I A V K S C M L S H S E S L E D E I	37
<i>FRK1</i> PI230582	61	E F L R M C Q D C P H V I R S F G V K V T Q E D D I L L Y N	90
<i>FRK1</i> G4	61	E F L R M C Q D C P H V I R S F G V K V T Q E D D I L L Y N	90
<i>FRK1</i> PI230582 PCR	38	E F L R M C Q D C P H V I R S F G V K V T Q E D D I L L Y N	67
<i>FRK1</i> PI230582	91	L L L E Y A S A G S L A D R L L N N D Q L G L P E F Q V Q N	120
<i>FRK1</i> G4	91	L L L E Y A S A G S L A D R L L N N D Q L G L P E F Q V Q K	120
<i>FRK1</i> PI230582 PCR	68	L L L E Y A S A G S L A D R L L N N D Q L G L P E F Q V Q K	97
<i>FRK1</i> PI230582	121	H T K S V L L G L R F I H R K G I I H C D I K P H N I L L T	150
<i>FRK1</i> G4	121	H T K N V L L G L R F I H R K G I I H C D I K P H N I L L T	150
<i>FRK1</i> PI230582 PCR	98	H T K N V L L G L R F I H R K G I I H C D I K P H N I L L T	127
<i>FRK1</i> PI230582	151	S T D D D D A E E V A K I A D F G L S L T L E Q S W T Q T Q	180
<i>FRK1</i> G4	151	S T D D D D A E E V A K I A D F G L S L T L E Q S W T Q K Q	180
<i>FRK1</i> PI230582 PCR	128	S T D D D D A E E V A K I A D F G L S L T L E Q S W T Q K Q	157
<i>FRK1</i> PI230582	181	G M R G T K R Y M A P E S L L K Q E Y G P E A D I W A L G C	210
<i>FRK1</i> G4	181	G M R G T K R Y M A P E S L L K Q E Y G P E A D I W A L G C	210
<i>FRK1</i> PI230582 PCR	158	G M R G T K R Y M A P E S L L K Q E Y G P E A D I W A L G C	187
<i>FRK1</i> PI230582	211	T V Y E L I T G T P L W E S S N S D P E F D D V L H R I M Y	240
<i>FRK1</i> G4	211	T V Y E L I T G T P L W E S S N S D P E F D D V L H R I M Y	240
<i>FRK1</i> PI230582 PCR	188	T V Y E L I T G T P L W E S S N S D P E F D D V L H R I M Y	217
<i>FRK1</i> PI230582	241	E E P N L E N D K L S T E A K D F M S Y C L I K N P K S R W	270
<i>FRK1</i> G4	241	E E P N L E N D K L S T E A K D F M S Y C L I K N P K S R W	270
<i>FRK1</i> PI230582 PCR	218	E E P N L E N D K L S T E A K D F M S Y C L I K N P K S R W	247
<i>FRK1</i> PI230582	271	S A G L L L N H S F L K S A D S V L P P K K R K R Q Q V T C	300
<i>FRK1</i> G4	271	S A G L L L N H S F L K S A D S V L P P K K R K R Q H G Y M	300
<i>FRK1</i> PI230582 PCR	248	S A G L L L N H S F L K S A D S V L P P K K R K R Q H G Y M	277
<i>FRK1</i> PI230582	301	P G Y R G E R - - - K H S G H S H T F V I W L	320
<i>FRK1</i> G4	301	S R L Q R R K K A F R T Q P H I R H L V I D L	323
<i>FRK1</i> PI230582 PCR	278	S R L Q R R K K A F R T Q P H I R H L V I D L	300

Figure 18 : Schématisation des constructions de complémentation et de délétion du promoteur *ScFRK1*.

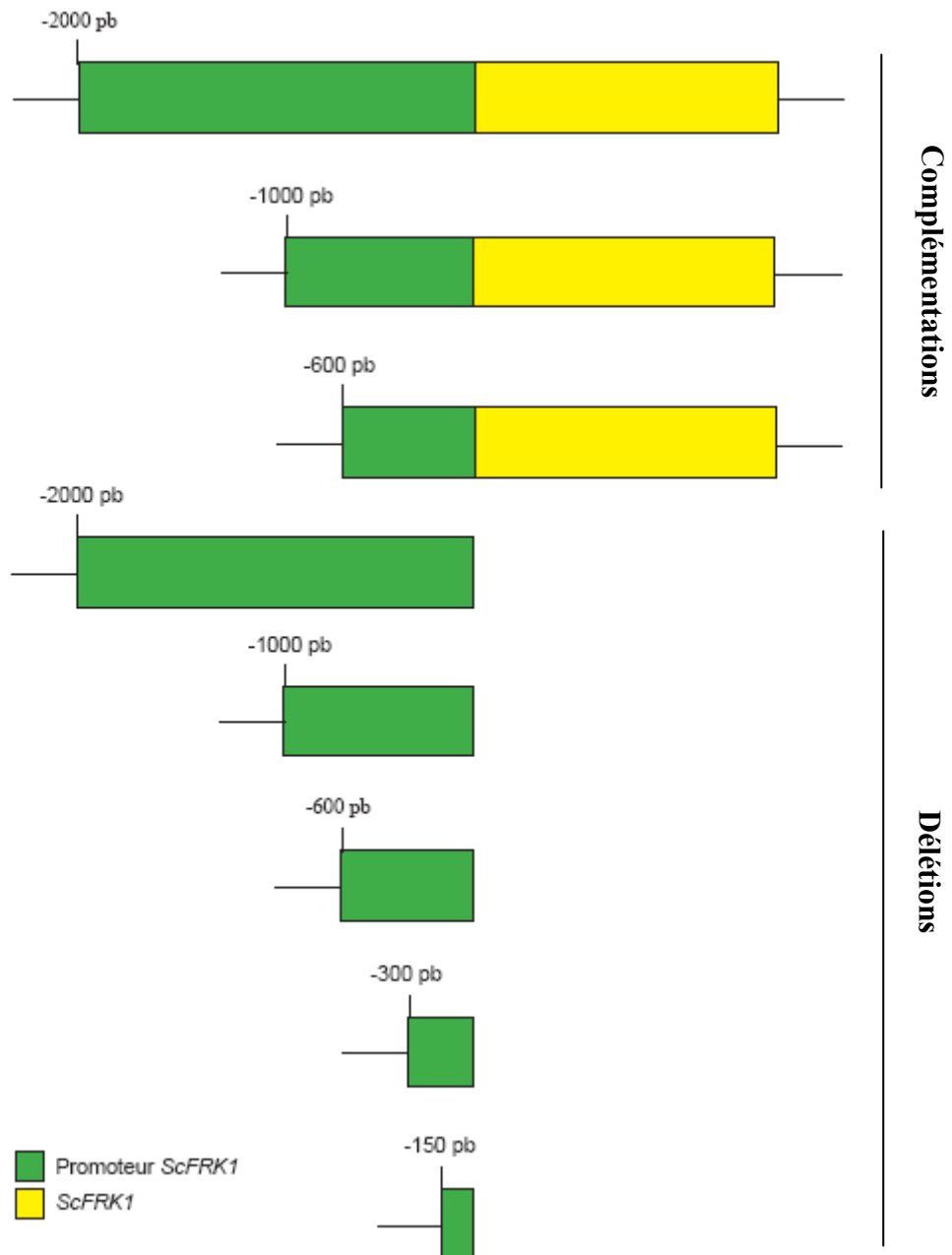
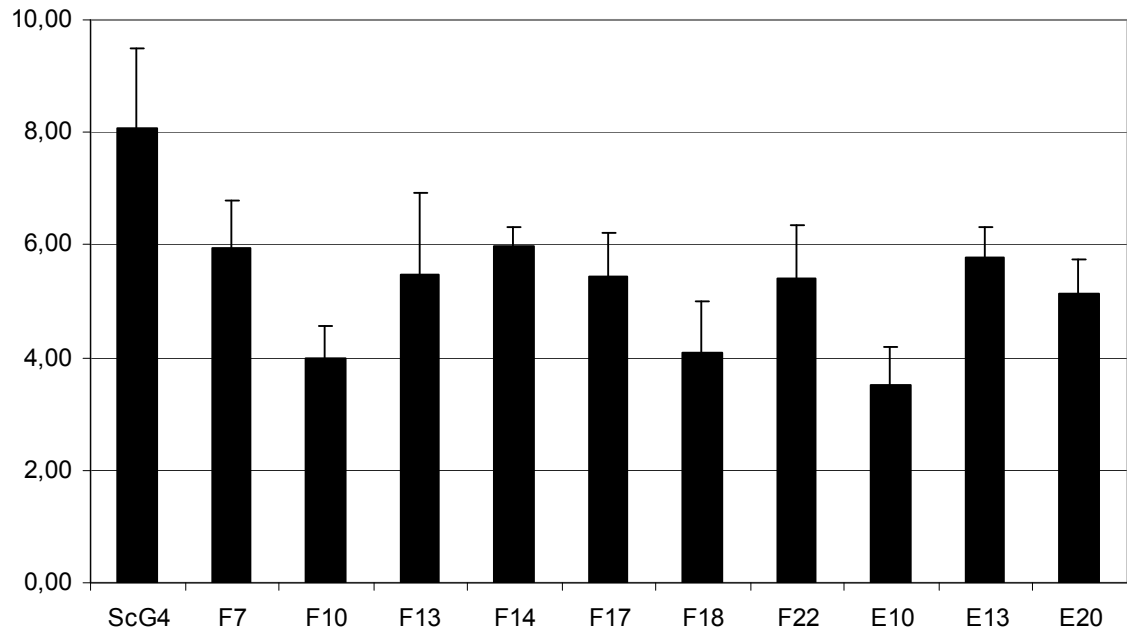
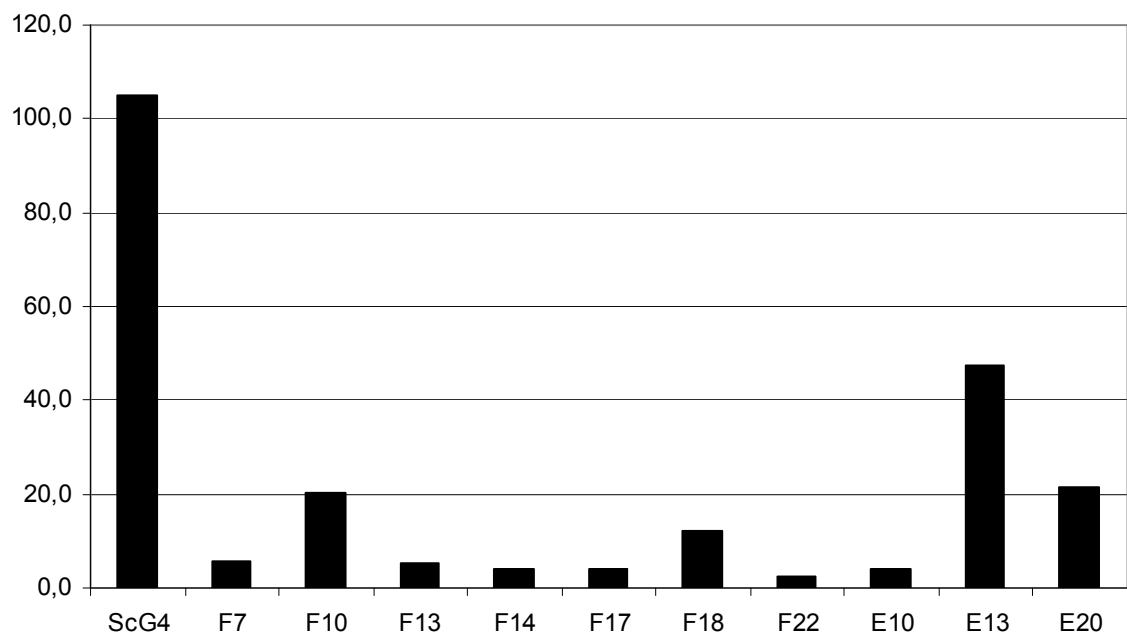


Figure 20 : Analyses de croissance et de développement des fruits matures provenant des croisements entre les différentes constructions de complémentation du promoteur *ScFRK1* et le contrôle ScV22 30 jours après pollinisation. **A** Graphique du volume des fruits (cm^3). **B** Graphique du nombre de graines moyen par fruit. F7, F10, F13, F14, F17, F18 et F22 : complémentation avec 600 pb de la séquence promotrice. E10, E13 et E22 : complémentation avec 1000 pb de la séquence promotrice.

A



B



4. Discussion

4.1 Expression spatio-temporelle de *ScFRK1*

Mais quel pourrait donc être le ou les rôles du gène *ScFRK1* au sein de la plante? À la lumière des résultats obtenus précédemment, une première hypothèse a été de supposer que le gène joue un rôle de régulateur négatif du développement embryonnaire. En effet, son transcrite diminue graduellement vers 36 h AP jusqu'à sa disparition totale à 48 h AP, période durant laquelle se déroule la fécondation (Fig. 6- A). Ici, l'absence de la protéine pourrait permettre ou finaliser le développement embryonnaire. De plus, sa détection est bien visible au niveau des ovaires (Fig. 6- B), plus spécifiquement à la zone micropylaire du sac embryonnaire à l'anthèse (Fig. 6- C).

Cependant, suite à une pollinisation compatible et selon les lignées analysées, les plantes des lignées transgéniques sous-exprimant le gène produisent des fruits de taille réduite et dans lesquels environ 15% des graines ou moins se développent. De ces plantes, la lignée *Scfrk1* AS13 provient de constructions antisens, alors que les lignées *Scfrk1* S1 et S27 dérivent de constructions sens co-supprimées. L'expression du gène est alors nulle ou très faible. Des copies multiples d'un gène entraînent fréquemment son « silencing » ou sa co-suppression et la probabilité que ces phénomènes se produisent augmente avec l'augmentation du nombre de copies (Atkinson et al., 1998). Les lignées *Scfrk1* S1 et S27 sont des exemples de ce phénomène. Le fait que seules des plantes sous-exprimant *ScFRK1* aient montré ce phénotype de même que la détection limitée du transcrite aux cellules micropylaires de l'ovule laissent supposer que le gène agirait plutôt en tant qu'activateur du développement du gaméophyte femelle. Il serait possible que *ScFRK1* soit impliqué avant et/ou pendant la fécondation en permettant le développement d'un sac embryonnaire réceptif et fonctionnel.

De plus, l'analyse de type Northern des niveaux d'ARNm dans les ovaires à différents stades de développement montre une présence significative et relativement stable de *ScFRK1* jusqu'à l'abscission naturelle de la fleur non-pollinisée, soit environ 3 jours après l'anthèse (Fig. 6- B). Il se peut donc qu'un signal, produit au niveau du stigmate ou du style lors de la déposition des grains de pollen, permette d'activer une voie de signalisation contrôlant l'élimination des transcrits d'ARNm présents dans l'ovaire et l'arrêt de production de nouveaux transcrits.

4.2 Phénotype

4.2.1 Observations des organes femelles et des fruits

La création d'un mutant produisant des fruits sans graines ouvre de multiples avenues de recherche. En effet, s'il n'y a pas de graine, est-ce parce que la fécondation n'a pas eu lieu? Si elle n'a pas eu lieu, comment se fait-il qu'il y ait tout de même développement d'un fruit, quoique plus petit chez cette plante? S'il n'y a pas de graine, est-ce parce que l'ovule est anormal?

Généralement, la grosseur des fruits varie selon le nombre de graines qu'ils contiennent. Nous savons que divers organes, dont les embryons lors de la phase finale de leur développement, relâchent des phytohormones comme la gibbérelline et/ou l'auxine pour assurer la division et l'expansion cellulaire chez la tomate (Balbi and Lomax, 2003; Olimpieri et al., 2007). Ainsi, la taille d'un fruit peut être liée à la quantité d'auxine embryonnaire (Balbi and Lomax, 2003) et, en absence de fécondation, comme chez le mutant *Scfrk1*, la quantité d'hormone produite est insuffisante pour soutenir la croissance des fruits.

Quoique plus petits, les fruits des lignées transgéniques contiennent quelques

graines (Fig. 7- A). Certains tubes polliniques ont alors réussi à gagner l'ovaire. Il est alors possible que la protéine ScFRK1 soit produite en faible quantité mais suffisante pour jouer un rôle dans la fécondation. En effet, les plantes produites sont le fruit du silençage partiel du gène *ScFRK1*, tel que visible dans les plantes transgéniques qui ne sont pas des « Knock-out », mais plutôt des « Knock-down ». Nous savons qu'en général les MAPK agissent en très faible quantité. C'est pourquoi, afin d'augmenter nos chances de trouver une composante d'une voie de signalisation impliquée dans la fécondation et/ou le développement embryonnaire, nous avons créé une banque d'EST et choisi les gènes les plus faiblement exprimés (Germain et al., 2005). Pour le mutant *Scfrk1* S1, qui présente les fruits les plus petits, l'accumulation du transcrit est beaucoup moindre que chez les autres mutants (Fig. 7- B et C). Bien que nous n'avons pas d'anticorps ciblé contre ScFRK1 afin de confirmer cette hypothèse, nous pouvons supposer que des différences mineures au niveau de la quantité totale de la protéine peuvent influencer significativement la fécondation, comme ce serait le cas entre *Scfrk1* S1 et *Scfrk1* S27. Les deux mutants présentent un résultat d'expression semblable du gène, soit une très forte diminution dans l'accumulation du transcrit de *ScFRK1* lorsque comparée à celui produit dans les plantes de type sauvage. Cependant, l'expression est plus faible chez *Scfrk1* S1 (Fig. 7- B). De plus, ils diffèrent quant au nombre de graines produites (Fig. 7- A). En tenant compte de la stoechiométrie classique des MAP kinases (1 MAP3K : 1 MAP2K : 1 MAPK), la sous-production de la MAP3K peut entraîner la formation d'un nombre insuffisant de complexes actifs à l'intérieur d'une voie de signalisation, comme chez les MAP kinases MPK3 et MPK6 (Wang et al., 2008).

Selon Kapfer (2003), les plantes sur-exprimantes n'ont pas montré de phénotype particulier, ce qui laisse croire que la protéine est naturellement en saturation dans les organes reproducteurs. Elle agirait donc en deçà de la quantité normalement présente chez le contrôle ScG4 nécessaire pour l'obtention de la formation maximale des sacs embryonnaires (Kapfer, 2003). Malgré une faible différence entre *Scfrk1* S1 et S27,

délectable toutefois par analyse de Northern, la différence notable dans le nombre de sacs embryonnaires normaux et son corollaire ainsi que celle observée dans le nombre de graines produites pourraient être attribuables à un effet de seuil. En dessous d'une certaine quantité d'ARNm, et donc possiblement de protéines ScFRK1 produites, il se pourrait qu'un nombre insuffisant de complexes kinases soient produits pour assurer la formation normale du sac embryonnaire. À cet effet pré-fécondation, il faut aussi noter que, *ScFRK1* étant aussi exprimé à l'anthèse et après la fécondation (Fig. 6- B), un second effet, celui-ci post-fécondation, ne peut être exclus. Ceci augmenterait d'autant l'effet phénotypique chez un mutant très fortement affecté dans l'expression de *ScFRK1*, comme *Scfrk1* S1. Des méthodes d'analyse de l'accumulation des ARNm comme le RT-Q-PCR permettraient aussi de révéler des différences plus importantes entre les mutants *Scfrk1* S1 et S27.

Le Northern blot de la figure 7 indique que le mutant *Scfrk1* AS13 contient un niveau clairement détectable de messenger *ScFRK1* et supérieur à celui de la lignée mutante *Scfrk1* S27. Cependant, il présente des fruits de grosseur moindre. Quoiqu'il démontre le même défaut phénotypique et une faible quantité de sacs embryonnaires fonctionnels, *Scfrk1* AS13 ne peut pas être totalement comparé aux autres mutants particulièrement au point de vue de la grosseur des fruits puisqu'il s'agit d'une lignée tétraploïde.

Aucune graine avortée n'a été trouvée lors des dissections des fruits des lignées mutantes. Nous pouvons alors conclure que le défaut apparaît à une étape du développement antérieure à la fécondation ou lors de la fécondation elle-même. Les observations en microscopie DIC des ovules ScG4 à différents stades de développement avant l'anthèse nous ont permis de déterminer que la formation du sac embryonnaire débute dans les ovules des bourgeons floraux mesurant ~2 mm (Tab. I). Une fois que l'intervalle de mesure correspondant à la formation du sac embryonnaire a été déterminée chez le témoin type sauvage, nous avons répété la procédure avec le mutant *Scfrk1* S1. Les observations démontrent que chez le mutant, le déroulement de la mégasporogenèse est

identique à celui du témoin type sauvage. Le problème survient suite à la différenciation de la mégaspore fonctionnelle. Chez le témoin, alors que les différentes cellules d'un sac embryonnaire normal se forment par division et migrent vers leur position respective au cours de la mégagamétogenèse, un sac embryonnaire absent ou incomplet est observé chez le mutant. En effet, soit que l'espace normalement occupé par le sac embryonnaire est rempli, que ce dernier soit fortement rétréci et dépourvu de cellules ou bien qu'une seule cellule persiste en son centre (Fig. 10). Ainsi, une sous-expression de *ScFRK1* affecte la formation du sac embryonnaire suite à la différenciation de la mégaspore fonctionnelle et le gène semble nécessaire à l'initiation de la mégagamétogenèse.

Dans la littérature, d'autres études rapportent un phénotype semblable. Par exemple, chez *A. thaliana*, une mutation du gène *AGP18* entraîne également l'arrêt du développement du sac embryonnaire dès la différenciation de la mégaspore fonctionnelle (Acosta-Garcia and Vielle-Calzada, 2004). Pour sa part, le mutant *pat* chez la tomate (*S. lycopersicum*), présente des fruits contenant un très faible nombre de graines et dans ce cas, la parthénocarpie s'accompagne par un haut degré de stérilité femelle. En fait, la majorité des ovules dont l'apparence semble normale à l'anthèse ne sont pas correctement développés. En effet, la croissance des téguments cesse très tôt au cours du développement. À cela s'ajoute une méiose défectueuse. Alors que la mutation chez *AGP18* semble spécifique au développement femelle, la mutation *pat* affecte également le développement des anthères qui sont plus petits et anormalement incurvés. D'après les résultats obtenus au cours de cette étude, la parthénocarpie peut être induite en tant qu'effet secondaire d'une mutation de gènes impliqués dans l'identité et le développement des organes sexuels (Mazzucato et al., 1998).

4.2.2 Observations des grains de pollen

Alors que la morphologie des anthères et le moment de leur déhiscence semblent normaux, l'observation des grains de pollen au carmin acétique révèle un défaut au cours de leur développement (Fig. 8). La plupart des mutations qui affectent le développement des anthères ou celui du pollen reposent sur un défaut au cours de la méiose ou de la mitose (résumé dans Ma, 2005). Dans notre cas, le problème semble survenir avant que ne se produise la mitose, mais bien après qu'ait lieu la méiose. Le développement semble normal dans la lignée mutante jusqu'à la séparation des tétrades. En effet, il est possible de remarquer que le développement de la microspore survient sans problème, mais qu'au-delà de ce stade, seule une très faible fraction de ces microspores se transforment en grains de pollen viables avec une accumulation visible d'amidon et la création des deux cellules génératives (Fig. 9).

Ainsi, les observations microscopiques nous ont révélé que la mutation affecte à la fois la formation des gamétophytes femelles et mâles. Ceci suggère que de nombreuses phases de la gamétogenèse, comme la mitose, la cellularisation ou l'expansion cellulaire, sont générales et probablement régulées par les mêmes gènes. L'étude menée par Pagnussat, où un haut taux (un peu plus de 50%) de mutants gamétophytiques mâles sont aussi retrouvés dans certains criblages pour des mutants gamétophytiques femelles, permet de confirmer cette hypothèse (Pagnussat et al., 2005).

4.3 Analyse phylogénétique

4.3.1 « Garden blot »

À la lumière des résultats obtenus, il semble, malgré notre faible échantillonnage, que des gènes très similaires à *ScFRK1* sont retrouvés principalement dans le genre

Solanum puisqu'il n'est pas détecté chez *N. tabacum*, l'espèce hors groupe utilisée pour l'enracinement de l'arbre. Nous entendons par gènes très similaires, des gènes possédant suffisamment d'identité de séquence avec *ScFRK1* pour être détectable lors d'une hybridation moléculaire, par exemple dans une analyse de type Southern. Il est en fait possible de tirer cette conclusion puisque le « Garden blot » de la figure 12 a été réalisé avec d'autres espèces de genres voisins à *Solanum*, dont plusieurs Solanacées (résultat non-présenté puisqu'aucune bande y apparaît). Aucune bande n'est donc apparue en présence d'ADNg d'*A. thaliana* (*Brassicacée*), de *Capsicum annuum* (*Solanacée*, piment doux), d'*Helianthus annuus* (*Astéracée*, tournesol), de *Petunia* var. *hybrida* (*Solanacée*), d'*Ipomea batatas* (*Convolvulacée*, patate douce) et de *Physalis pruinosa* (*Solanacée*, cerise de terre). Même *Solanum melongena* (*Solanacée*, section *Melongena*, aubergine), n'a donné aucun signal à stringence élevée, alors que *S. lycopersicum* (*Solanacée*, section *Lycopersicum*) ne présente qu'une seule copie d'un gène similaire à *ScFRK1*. À part *S. lycopersicum*, toutes les Solanacées ayant montré un signal d'hybridation proviennent de la section *Petota* (anciennement aussi appelée *Potatoe*), une section regroupant plus de 200 espèces, dont la pomme de terre cultivée (*S. tuberosum*) et des pommes de terre sauvages, portant toutes des tubercules généralement à l'extrémité des stolons (Spooner et al., 2004).

Il a été démontré qu'au moins trois copies du gène *ScFRK1* se retrouvent dans le génome et que sa séquence est exempte d'introns (Caron, 2002). Le « Garden blot » montre quatre bandes distinctes pour *S. chacoense*, ce qui laisse supposer que le gène peut se retrouver en plus un grand nombre de copies, soit jusqu'à quatre copies (Fig. 12). Cependant, il est également possible que *ScFRK1* possède des équivalents alléliques produisant un polymorphisme de la longueur des fragments de restriction (PLFR ou RFLP; polymorphisme de longueur des fragments de restriction / restriction fragment length polymorphism). En effet, lorsque nous avons analysé sa séquence à l'intérieur de ScG4 et comparé à celle initialement retrouvée dans l'un des ses plants parents, le plant contrôle Sc582, nous avons remarqué qu'elles sont toutes deux très semblables à l'exception d'une

base azotée supplémentaire, résultat possible d'une mutation (Fig. 17). Cette variante du gène peut expliquer la détection de plus d'une bande par la sonde correspondant à l'ADNc de *ScFRK1* retrouvé dans Sc582. Puisqu'une seule bande est détectée suite à une hybridation avec la sonde *ScFRK1* dans nos analyses de type Northern, ceci suggère que les différentes copies du gène *ScFRK1* produisent des transcrits de même taille et que la diminution ou l'élimination de son transcrit par un effet antisens ou de co-suppression affecte toutes les copies de ce gène. L'apparition d'un phénotype suite à cette mutation indique qu'il n'y a aucune redondance fonctionnelle et que le gène *ScFRK1* est essentiel à la reproduction sexuée.

Nous remarquons aussi que, lors d'une hybridation avec la sonde *ScFRK1*, toutes les Solanacées provenant de la section *Petota*, qui forme un clade fortement supporté (Spooner et al., 2008), ont des profils de bandes multiples lorsque comparées à celui de la tomate (*S. lycopersicum*). Ceci suggère des événements de duplication de ce gène dans la section *Petota*, possiblement ultérieurs à sa séparation d'avec le clade sœur comprenant la section *Lycopersicum*. De plus, la présence de bandes RFLP partagées par plusieurs espèces semble indiquer soit une parenté évolutive, soit des événements d'hybridation interspécifique, soit les deux. Nous avons nous-même pu démontrer la facilité à obtenir de tels hybrides à partir de croisements entre ces espèces (Tab. VIII).

4.3.2 Phylogénie

Il est très difficile de tracer la phylogénie au sein des Solanacées. La plupart des confusions taxonomiques s'expliquent par le haut degré de similarités morphologiques et les croisements interspécifiques responsables de la création de nombreux hybrides (Volkov et al., 2003). Au cours des dernières années, de nombreuses études ont tenté de retracer les relations phylogénétiques présentes au sein de cette famille. Ces analyses se basent généralement sur des gènes codant pour un caractère morphologique, cytologique ou

biochimique conservé entre différentes espèces plus ou moins rapprochées (Bohs and Olmstead, 1997). Par exemple, Bohs et Olmstead (1997) ont basé l'une de leurs études sur la région *ndhF*, codant pour une sous-unité d'une présumée NADH déshydrogénase essentielle à la respiration chloroplastique (Sugiura, 1992; Bohs and Olmstead, 1997). Pour leur part, d'autres chercheurs ont restreint leur analyse phylogénétique et se sont appuyés sur la région 5' ETS de l'ARN ribosomal (Volkov et al., 2003). Dans le même principe qu'une phylogénie moléculaire, les recherches taxonomiques peuvent aussi se baser sur la résistance de diverses espèces envers une maladie, dont la moisissure blanche (Jansky et al., 2006).

Les séquences ITS sont des ARNr non-codant qui se situent entre les régions codantes 18S et 5.8S (ITS 1) et 5.8S et 28S (ITS 2). Les séquences 5' ETS et 3' ETS (*external transcribed sequence*) se retrouvent aux extrêmes des séquences codantes 18S et 28S respectivement. Au cours de la maturation des ARNr, les séquences ITS et ETS sont excisées et dégradées. Largement utilisées en taxonomie et en phylogénie moléculaire, les séquences ITS ont l'avantage de présenter un fort nombre de copies faciles à amplifier et un haut degré de variation, même entre espèces très proches. Ceci peut s'expliquer par la pression de sélection relativement faible sur ces séquences, les rendant ainsi hautement conservées au sein des angiospermes. Cependant, leur séquence contient également des régions variables d'une espèce à l'autre, permettant ainsi une discrimination phylogénétique (Baldwin, 1992; Liu and Schardl, 1994). De plus, il est important de préciser qu'il existe deux centres géographiques de diversité des pommes de terre sauvages : le Mexique et l'Amérique du Sud. Selon l'origine de la pomme de terre, son emplacement dans l'arbre phylogénétique risque d'être modifié. Les espèces choisies pour la création de la phylogénie de ce présent travail proviennent de différents lieux et s'intègrent dans différentes séries de la section *Petota* (Hawkes and Hjerting, 1969).

L'arbre phylogénétique obtenu à partir des séquences ITS de chacune des espèces choisies (Fig. 13) concorde avec les différentes analyses phylogénétiques réalisées

antérieurement sur le genre *Solanum*. En effet, une analyse phylogénétique appuyée sur la région 5' ETS de l'ARN ribosomal supporte notre phylogénie, à la seule différence qu'elle évoque *S. berthaultii* (Volkov et al., 2003) plutôt que son synonyme *S. tarijense* (Spooner et al., 2007). Notre phylogénie montre une étroite relation entre *S. chacoense* et *S. tarijense*, deux espèces généralement classées dans la même série (Hawkes and Hjerting, 1969). En fait, l'association de certaines espèces dans l'arbre supporte l'analyse moléculaire puisque les espèces qui partagent plus d'une bande entre elles dans le « Garden blot » semblent se regrouper phylogénétiquement. C'est le cas, par exemple, de *S. bulbocastanum*, *S. commersonii* et *S. microdontum* qui partagent des bandes communes différentes du patron de *S. chacoense* (Fig. 13 et 14). Ainsi, toutes les espèces de pomme de terre sauvages utilisées dans cette phylogénie se regroupent entre elles. La tomate (*S. lycopersicum*), quoiqu'incluse dans la famille des Solanacées mais dans une section différente, se retrouve pour sa part à l'extérieur de ce groupe comme l'est *N. tabacum*.

4.4 Guidage des tubes polliniques

Deux possibilités peuvent expliquer le faible nombre de fécondations réalisées dans la lignée mutante. La première est que les tubes polliniques ne se rendent tout simplement pas aux ovules (phase sporophytique) ou bien qu'ils se rendent à destination, mais ne parviennent pas à les féconder (phase gamétophytique). Avant de débiter les expérimentations de guidage en système semi-*in vivo*, une première approche microscopique basée sur la technique Hoyer (Shimizu and Okada, 2000) avait permis d'observer la croissance des tubes polliniques à l'intérieur du style. Brièvement, cette technique consiste à écraser délicatement sur lamelle les styles de ScG4 ou du mutant *Scfrk1* S1 pollinisés par ScV22 et colorés au bleu d'aniline après leur éclaircissement. La croissance des tubes polliniques peut alors s'observer en microscopie à fluorescence. Ainsi, nous avons remarqué que leur croissance était normale et commune au mutant et au type sauvage. En effet, dans les deux cas, l'ensemble des tubes polliniques se divisait au niveau

du col de l'ovaire correspondant à la fin du style. Cependant, une fois pénétrés dans l'ovaire, les tubes polliniques de la lignée mutante ne semblaient pas être attirés vers les ovules. Alors que la trajectoire des tubes polliniques du témoin semblait précise et ordonnée, la croissance chez le mutant était plutôt aléatoire. De plus, en comparaison avec le témoin, nous avons remarqué que les tubes polliniques avaient tendance à dévier de l'ovule plutôt que d'y pénétrer (résultats non présentés). Ces observations éliminaient alors la première hypothèse et nous informaient d'un problème lors de la phase gamétophytique du guidage.

Le guidage des tubes polliniques requiert de multiples signaux provenant à la fois des tissus sporophytiques femelles et de différentes cellules du sac embryonnaire (Higashiyama et al., 2001; Chen et al., 2007; Alandete-Saez et al., 2008). Pour visualiser le guidage, nous avons opté pour un système semi-*in vivo* afin de conserver l'interaction avec les tissus sporophytiques du style (Fig. 11). Le passage à travers le style supporte adéquatement la croissance des tubes polliniques et leur assure la compétence à répondre aux signaux d'attraction émis par les tissus gamétophytiques (Palanivelu and Preuss, 2006). De plus, nous savons que le signal d'attraction final provient du sac embryonnaire, mais il est possible que les tissus sporophytiques environnants le complètent, le précisent ou même l'amplifient (Mazzucato et al., 1998; Palanivelu et al., 2003). Par exemple, le mutant *ino* possède un gamétophyte femelle intact, mais les ovules sont dépourvus de téguments externes. Cette mutation perturbe le guidage funiculaire des tubes polliniques à l'approche des ovules (Baker et al., 1997). Donc, pour optimiser le guidage, nous avons utilisé des amas d'ovules toujours retenus par le placenta plutôt que des ovules individuels.

À quelques reprises, les tubes polliniques sont peu ou pas sortis à l'extrémité du style coupé positionné sur le milieu de croissance. L'un des facteurs limitant le développement des fruits est la grande sensibilité de la pollinisation aux températures et aux taux d'humidité inadéquats. La croissance des tubes polliniques et le développement

des gamètes mâles sont également susceptibles aux fluctuations environnementales (résumé dans Gorguet et al., 2005). Malgré que ces deux paramètres soient contrôlés à l'intérieur des serres de croissance, il est fréquent que des variations y soient observées selon les saisons. De plus, le milieu artificiel utilisé contient du calcium, du borate et des sucres. Pour la plupart des angiospermes, ces nutriments sont essentiels à la croissance des tubes polliniques (Higashiyama et al., 1998). Cependant, même si la nature et les quantités des éléments qui composent le milieu ont été optimisées, il mime uniquement une partie du tissu sporophytique femelle dans lequel croissent idéalement les tubes polliniques. De meilleurs résultats, autant dans la croissance que dans la fréquence d'attraction, pourraient s'obtenir par l'ajout d'extraits dérivés du stigmate ou du style. Il est aussi important de souligner que la croissance des tubes polliniques se produit en milieu fermé et le contact avec l'air libre lors de leur sortie du style peut perturber cette dernière. Même minime, le stress mécanique lors du retrait du style sur la fleur peut influencer la croissance des tubes polliniques. De plus, seuls les tubes en contact avec le milieu peuvent croître. Selon l'angle de l'extrémité du style sur la gélose ou de son site (angle) de coupure, certains tubes restent en suspend et n'entrent pas en contact avec la gélose.

Puisque le croisement avec le pollen ScV22 sur les plants ScG4 est parfaitement compatible, les ovules de ce dernier ont été utilisés comme contrôle lors des essais où les ovules testés sont positionnés d'un seul côté du style. Dans un tel cas, nous nous attendions à un fort pourcentage d'attraction. Même s'il n'est que d'environ 60%, il est statistiquement très significatif lorsque comparé aux mutants, aux autres espèces ou aux ovules ayant subis divers traitements. Le fait de ne pas atteindre une mesure d'attraction de 100% peut s'expliquer par une diffusion insuffisante ou interrompue du signal d'attraction. En effet, les ovules testés sont positionnés sur le milieu de croissance et le signal émis doit alors diffuser en surface ou sur la couche supérieure de la gélose. La mince pellicule d'eau de surface peut diluer sa concentration et donc sa capacité d'attraction. Certaines explications décrites dans le précédent paragraphe peuvent également s'appliquer à ce problème. Il ne

faut pas non plus oublier la nature même du système semi-*in vivo* qui, en introduisant une discontinuité dans la croissance des tubes polliniques, occulte complètement la phase de guidage funiculaire, rendant ainsi moins efficace la phase d'attraction micropylaire.

De plus, le pourcentage d'attraction en direction des ovules ScG4 âgés de 2 j est plus élevé que celui obtenu en présence d'ovules à l'anthèse (Tab. V). Nous savons que le sac embryonnaire doit être mature pour assurer la phase micropylaire (Palanivelu and Preuss, 2006) et il est probable qu'à l'anthèse, certains ovules n'ont pas atteint ce stade. Du même coup, le signal d'attraction émis risque d'être plus faible. Au-delà de 2 j après l'anthèse, les ovules n'ont plus aucun intérêt à attirer les tubes polliniques puisqu'ils suivront prochainement la sénescence de la fleur.

Le système semi-*in vivo* a aussi permis d'observer si le guidage des tubes polliniques est affecté en présence d'ovules des lignées *Scfrk1* S1 et SP10. Afin de confirmer que le défaut de guidage provient de l'absence d'un sac embryonnaire fonctionnel et non d'une anomalie au niveau des gamétophytes mâles, le pollen de la lignée contrôle a été utilisé lors des essais. Malgré un sac embryonnaire anormal, la présence des téguments intacts chez les plantes testées pourrait accroître le potentiel d'attraction des tubes polliniques. Ceci expliquerait le pourcentage, quoique très faible, des tubes polliniques qui se sont dirigés vers les ovules des lignées à l'essai (Tab. III) et, par le fait même, la présence de graines viables dans les fruits de la lignée *Scfrk1* S1 après pollinisation (Fig. 7). De plus, les études portant sur les mutants reliés au guidage des tubes polliniques montrent qu'une mutation sur un seul gène n'est pas suffisante pour bloquer complètement les chances des tubes polliniques d'atteindre et de féconder les ovules. Il est alors possible qu'un ou des mécanismes de signalisation puissent compenser l'absence d'un gène pour chaque phase d'attraction (Johnson and Lord, 2006), sans oublier la possibilité aléatoire qu'un tube se rende à bon port par le seul guidage physique, en suivant par exemple le funicule jusqu'au micropyle.

Nous savons que, malgré l'attraction, un seul tube pollinique atteint le micropyle. Il est proposé qu'une molécule de répulsion serait émise par l'ovule suite à la pénétration du tube, évitant ainsi le phénomène de polyspermie (Palanivelu and Preuss, 2006). Un essai avec des ovules 48-72 h AP a permis de vérifier cet effet. Les résultats obtenus appuient cette hypothèse puisque les tubes polliniques ne sont pas attirés vers les ovules fécondés (Tab. IV). Une répulsion des tubes a de plus été notée lors de certaines observations (données non présentées).

Si la fécondation affecte négativement le pouvoir d'attraction des ovules, qu'en est-il de la pollinisation? En effet, pourquoi produire un attractant alors qu'il n'y a pas encore de pollen dans le style? Des résultats d'analyse transcriptomique, obtenus lors de différents types de pollinisations, indiquent qu'il existe des gènes spécifiquement activés par la pollinisation compatible et qui ne le sont pas lors d'un croisement incompatible (observations non publiées tirées de la thèse de Faiza Tebbji, La régulation génique chez *Solanum chacoense* : de la pollinisation jusqu'à l'embryogenèse). Ainsi, il serait logique de supposer que la pollinisation entraîne la transcription/traduction ou la libération d'attractant(s) protéique(s)? L'essai en présence d'ovules 24 h AP a été repris pour répondre à cette question (Tab. IV). En utilisant les styles de ces mêmes fleurs dans le système, nous avons remarqué que le pourcentage d'attraction est semblable à celui obtenu en présence d'ovules du contrôle ScG4. La seule alternative valable est alors l'acquisition développementale de la compétence à guider les tubes selon l'état de différenciation du sac embryonnaire. L'utilisation d'ovules immatures a permis de prouver cette hypothèse (Tab. V). L'acquisition de la compétence à guider les tubes apparaît uniquement à partir de l'anthèse et est transitoire, chutant dans les fleurs plus âgées.

Qu'en est-il maintenant de la spécificité du signal d'attraction? Il a été démontré que les tubes polliniques sont orientés en direction des synergides provenant de leur propre

espèce et cette attraction diminue en fonction de la distance phylogénétique. La molécule diffusible de nature encore récemment méconnue serait alors spécifique à l'espèce et divergerait rapidement au cours de l'évolution (Higashiyama et al., 2006). C'est d'ailleurs ce que nous avons pu remarquer lors de nos essais en présence d'ovules de différentes espèces sauvages de *Solanum*. En effet, l'attraction des tubes polliniques vers les ovules des lignées ScV22 et ScG4, toutes deux de *S. chacoense*, est semblable (statistiquement non significative) quoique le pourcentage d'attraction vers un ovule de constitution génétique identique au niveau du locus S entraîne une baisse de l'attraction, possiblement liée à la sécrétion de S-RNase par l'épiderme des téguments de l'ovule (Matton et al., 1998). Cependant, avec les ovules des différentes espèces de *Solanum*, la proportion de tubes polliniques qui tournent en direction de ces ovules est significativement inférieure à la proportion de tubes polliniques qui tournent vers ScG4 (Tab. VI). Ce résultat est encore plus probant que ceux obtenus par les groupes d'Higashiyama (Higashiyama et al., 2006) et Palanivelu (Palanivelu and Preuss, 2006) qui, pour démontrer la spécificité de l'attraction à l'espèce, ont utilisé des espèces beaucoup plus éloignées que les nôtres, mais toutes du même genre taxonomique.

Quel serait alors le meilleur candidat pour le signal d'attraction? Plusieurs études permettent de rejeter le rôle principal de composés simples ou d'ions comme le calcium, le GABA ou l'oxyde nitrique (NO), des molécules qui sont davantage accessoires et complémentaires au signal d'attraction (Palanivelu et al., 2003; Palanivelu and Preuss, 2006; Prado et al., 2008). Le meilleur candidat d'attractant serait donc de nature protéique pour que les polymorphismes inter- et intraspécifiques puissent se fixer durablement et être transmis de génération en génération. La synthèse d'une molécule de nature protéique ou peptidique de faible poids moléculaire pour sa diffusion expliquerait également la spécificité à l'espèce grâce à la possibilité d'une évolution rapide. À la lumière des résultats dernièrement parus, nous croyons également que le ou les signaux impliqués dans le guidage sont de nature protéique ou peptidique. À notre tour, nous avons débuté des essais

basés sur cette hypothèse en utilisant des ovules bouillis. Ainsi dénaturés, les ovules ont perdu la capacité d'attirer les tubes polliniques (Tab. VII) et montrent la nature thermolabile du signal d'attraction. Cependant, ce résultat à lui seul ne prouve pas la nature protéique du signal. Le fait de bouillir les tissus permet à de nombreuses molécules, incluant des métabolites et des protéines, de s'échapper des ovules. Donc, dans l'optique de confirmer la nature protéique du signal, les travaux du Dr. M. Sabar dans notre laboratoire ont démontré la capacité d'extraits protéiques à attirer les tubes polliniques et ce, exactement de la même façon qu'en présence d'ovules intacts. Il a ainsi confirmé l'attraction par les ovules de type sauvage seulement et non par des ovules mutants de même que l'acquisition développementale de la capacité de guidage (Sabar, M. et Matton, D. P., observations non-publiées). D'ailleurs, une publication très récente décrit les polypeptides LURES, des peptides riches en cystéine de la famille des défensines, comme des candidats potentiels d'attractant chez *Torenia fournieri*. Comme d'autres polypeptides de type CRPs (cysteine-rich polypeptides), elles sont exprimées au niveau des synergides et semblent être sécrétées via l'appareil filiforme (Okuda et al., 2009). Cette étude permet de confirmer que le signal d'attraction est de nature protéique.

4.5 Croisements entre différentes espèces de *Solanum*

Naturellement ou par la main de l'homme, les croisements entre diverses espèces de pomme de terre ont permis la création de nouvelles espèces plus résistantes, plus attrayantes ou plus nutritives. Certaines espèces de *Solanum* sont reconnues pour leur résistance au froid, leur précocité ou leur résistance envers diverses maladies (Hawkes and Hjerting, 1969). L'incorporation de gènes reliés à ces résistances au sein du génome de *S. tuberosum* a permis d'améliorer les variétés cultivées ou d'en créer de nouvelles et représente encore aujourd'hui un impact économique majeur.

Il existe en général une intercompatibilité entre les différentes espèces diploïdes de

Solanum porteuses de tubercules (Grun, 1961), même si de nombreuses exceptions ont été répertoriées (Hawkes and Hjerting, 1969). Afin de vérifier ces observations, de nombreux croisements ont été effectués entre les génotypes de chaque espèce ainsi qu'entre les différentes espèces (Fig. 15 et Tab. VIII). Initialement, la diploïdie de chacune a été assurée par l'observation du nombre de chloroplastes à l'intérieur des stomates foliaires.

Les observations de croissance des tubes polliniques à l'intérieur de styles colorés au bleu d'aniline confirment le phénomène d'incompatibilité génétique lors des pollinisations interspécifiques pour toutes les plantes diploïdes. Alors que l'hydratation et la germination des grains de pollen se déroulent sans problème, la croissance des tubes est cependant ralentie ou même inhibée au niveau du tissu transmissif lors d'un croisement incompatible (Fig. 16). L'incompatibilité et l'incongruité sont toutes deux des barrières post-pollinisation. Alors que l'incompatibilité se réfère à un mécanisme actif et spécifique de rejet, l'incongruité est souvent davantage passive et un mauvais mariage pollen-pistil résulte en une croissance déficiente des tubes polliniques (résumé dans Lee et al., 2008). Une récente étude portant sur les barrières à l'hybridation chez *Nicotiana* a démontré que la longueur du pistil sur lequel est déposé le pollen est positivement corrélée avec la croissance des tubes polliniques. Des incongruités mineures, par exemple au niveau de molécules présentes dans le pistil, peuvent inhiber la croissance des tubes polliniques. Donc, un croisement interspécifique sera réussi lors d'une pollinisation sur un pistil dont la longueur et la composition est similaire à celui de l'espèce donneuse (Lee et al., 2008). Dans notre présent travail, les espèces utilisées possèdent des styles de longueur similaire, mais de légères différences, entre autre au point de vue moléculaire, peuvent expliquer l'échec de certains croisements.

S. chacoense forme facilement des hybrides avec d'autres espèces groupées dans la série *Commersoniana* ou d'autres séries très rapprochées. Cependant, certaines hybridations sont plus difficiles à réaliser, autant dans la nature qu'en situation

expérimentale (Hawkes and Hjerting, 1969). De nombreuses études portant sur les Solanacées ont démontré une stérilité reliée à l'incompatibilité d'un croisement ou à l'arrêt du développement des graines après fécondation (résumé dans Walker, 1955). À l'opposé du principe de l'intercompatibilité, une étude menée par Summer et Grun (1981) a démontré qu'il existe des barrières internes à l'échange génique entre *S. chacoense* et *S. commersonii*. Malgré la forte similarité morphologique entre les deux espèces, cette étude indique que la croissance des tubes polliniques de *S. commersonii* est inhibée à l'intérieur du style de *S. chacoense*, alors que l'inverse aboutit à la formation d'un fruit, mais dont le développement des graines est anormal. Au cours de ce présent travail, les croisements n'ont également fonctionné que dans une seule direction, soit lorsque le pollen de *S. chacoense* était utilisé sur les fleurs du génotype S3 de *S. commersonii*, un cas typique d'incompatibilité unilatérale (Nettancourt, 2001). En culture *in vitro*, malgré une forte proportion de graines minuscules, une régénération a été observée. Aucun fruit n'apparaît lors du croisement inverse (Tab. VIII). L'observation des tubes polliniques après coloration au bleu d'aniline confirme l'arrêt de leur croissance dans le style de *S. chacoense* un peu avant l'arrivée à l'ovaire (Fig. 16). Par contre, les croisements ont bien réussi dans les deux sens avec le génotype S4 de *S. commersonii*. Il est d'ailleurs noté qu'il est possible d'observer, bien que rarement, des hybrides dérivés de ce croisement dans les basses plaines de l'Argentine (Hawkes, 1962). Tout comme pour *S. commersonii*, *S. tarijense* est une espèce comprise dans la même série que *S. chacoense* et, expérimentalement, les croisements n'ont réussi que dans une seule direction, soit lorsque le pollen de *S. tarijense* était utilisé sur *S. chacoense*. Lors du croisement inverse, des fruits ont finalement été obtenus avec le génotype S12 et ont même permis la création de plantules *in vitro*. Les problèmes ici mentionnés peuvent s'expliquer par des différences polygéniques entre *S. chacoense* et ces deux espèces au niveau de gènes impliqués, entre autres, dans le développement des graines (Summers and Grun, 1981). Cependant, une dégénérescence au sein de l'ovule peut survenir à n'importe quel stade de développement, mais plus rarement à des stades très jeunes. Le problème apparaît souvent de façon progressive après les

divisions méiotiques et résulte en un rétrécissement ainsi qu'une apparence désordonnée à l'intérieur du sac embryonnaire (Rees-Leonard, 1935).

Les croisements entre *S. chacoense* et les génotypes de *S. microdontum* (S5 et S6) ou de *S. tuberosum* (S9 et S10) ont semblé les plus efficaces. En effet, les croisements aboutissent à la formation de fruits pourvus de graines viables dont des plantules sont facilement obtenues en culture *in vitro*, particulièrement pour *S. microdontum*. Il s'agit d'ailleurs de l'espèce avec laquelle *S. chacoense* forme des hybrides les plus couramment relatés dans la littérature (Hawkes, 1962; Miller and Spooner, 1996). Malgré que la taxonomie des espèces de *Solanum* demeure toujours controversée, ces deux espèces se retrouvent à l'intérieur de la série *Tuberosa*, *S. microdontum* étant une espèce sauvage alors que *S. tuberosum* est cultivée (Hawkes and Hjerting, 1969).

Lors des pollinisations avec le pollen de chaque espèce de *Solanum* sur les plants de ScV22, nous avons observé des croisements incompatibles avec les deux génotypes de *S. bulbocastanum* (S1 et S2, incompatibilité complète) et de *S. pinnatisectum* (S7 et S8, incompatibilité unilatérale ou UI). Pour ces deux mêmes espèces, la croissance des tubes polliniques à l'intérieur de style colorés au bleu d'aniline s'est arrêtée très tôt, suggérant ainsi une forte incompatibilité. Dans la nature, il est fréquent d'observer des hybrides dérivés d'un croisement entre ces deux espèces très rapprochées phylogénétiquement, mais très peu avec d'autres espèces de pomme de terre sauvages (Correll, 1962). De plus, il a été démontré que le croisement entre *S. pinnatisectum* et *S. chacoense* entraîne la formation d'un fruit, mais le développement des graines est défaillant suite à une croissance cellulaire de l'albumen ralentie et désorganisée (Lee and Cooper, 1958). Ce résultat concorde avec les observations faites lors des différents croisements. Des fruits sont obtenus uniquement lors du croisement de *S. pinnatisectum* avec le pollen de ScV22, mais les graines qui y sont retrouvées semblent avortées et ne peuvent germer (Tab. VIII). L'albumen représente la majeure source de réserves nutritives dont l'apport à l'embryon est contrôlé (Esau, 1977).

Son développement suit celui de l'embryon et dépend des mêmes gènes mais à différentes doses (Camadro et al., 2004). Normalement, le ratio viable de l'albumen est 2 :1 (génome maternel : génome paternel). Si ce ratio diffère, l'albumen dégénérera et ne permettra pas la formation d'un embryon viable. La notion d'EBN (*endosperm balance number*) permet de prédire et expliquer l'échec de certains croisements entre espèces possédant le même niveau de ploïdie, mais leur succès lorsque les espèces ont le même nombre EBN (Scott et al., 1998).

Comment expliquer la création d'hybrides entre certaines espèces de *Solanum* spp. et *S. chacoense* alors que l'attraction des tubes polliniques dans le système semi-*in vivo* était pratiquement nulle. Lors des croisements interspécifiques, les fruits obtenus étaient généralement de taille réduite en comparaison des fruits issus d'un croisement intraspécifique. Aussi, le nombre de graines était habituellement plus élevé dans ces derniers. De ces observations, il est possible d'envisager que, malgré une très faible attraction, suffisamment de tubes polliniques atteignent l'ovaire afin d'assurer la fécondation. C'est d'ailleurs le cas pour certaines espèces comme *S. tuberosum* (S9 et S10) chez qui le croisement interspécifique aboutit à la formation d'un fruit pourvu de graines viables quoiqu'en nombre réduit (Fig. 15 et Tab. VIII), mais donc les ovules, lorsque testés dans le système semi-*in vivo*, ne réussissent pas à attirer les tubes polliniques de *S. chacoense* (Tab. VI). Le très faible nombre de graines, probablement causé par un faible nombre de fécondations, peut expliquer la réduction de volume des fruits obtenus.

4.6 Isolement du promoteur

Les différents fragments de la séquence promotrice par ont permis d'effectuer des constructions de délétion et de complémentation du promoteur *ScFRK1* (Fig. 18). Les constructions de délétion insérées dans des plants témoins ScG4 servent à déterminer quelle section de la séquence promotrice est spécifique à l'expression observée lors des

hybridations *in situ* (au niveau des cellules de la zone micropylaire et téguments à maturité). Les constructions de complémentation à partir des mutants *Scfrk1* S1 permettent, pour leur part, de reconstituer le phénotype d'origine, soit le développement d'un sac embryonnaire fonctionnel à maturité. Nous n'avons cependant pas été en mesure de créer cette dernière mutation puisque la retransformation de la lignée mutante (possédant déjà un T-DNA dans son génome) ne semble pas fonctionner.

Présentement, une analyse microscopique plus approfondie des plantes dérivées des constructions de délétion permettra de déterminer plus spécifiquement les tissus où s'exprime le gène d'intérêt. Ensuite, la transformation dans le témoin ScG4 d'une construction comportant le gène *ScFRK1* exprimé sous le contrôle de son propre promoteur a aussi mené à la formation de fruits parthénocarpiques, ayant un nombre fortement réduit de graines (Figure 20) et dont les ovules sont défectueux dans le développement de leur sac embryonnaire, tout comme les lignées *Scfrk1* S1 et S27 (résultats obtenus par M. Théo Stafford-Richard). Par contre, contrairement aux transgéniques initiaux, ces nouvelles lignées ciblent plus spécifiquement les ovules puisque la taille des fruits obtenus est plus similaire aux fruits type sauvage. Cette différence s'explique probablement par l'utilisation du promoteur endogène de *ScFRK1* et non pas le promoteur viral du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV 35S).

5. Conclusion et perspectives

On peut maintenant affirmer que l'absence de graines dans les fruits du mutant est directement reliée au fait que la fécondation n'a pas lieu. Un ovule anormal, dans ce cas-ci dépourvu d'un sac embryonnaire fonctionnel, affecte le guidage et ne permet pas d'attirer les tubes polliniques. En effet, le développement du sac embryonnaire chez le mutant *Scfrk1 S1* s'arrête au stade de formation de la mégaspore fonctionnelle. Le gène *ScFRK1* est donc impliqué avant la fécondation, en permettant le développement du sac embryonnaire, une étape essentielle à la réceptivité des tubes polliniques, de même que lors du développement du gamétophyte mâle. Selon son patron d'expression, il serait probablement aussi impliqué pendant la fécondation. D'un point de vue biochimique, il serait intéressant de connaître les détails de l'activité protéique de ScFRK1, dont ses partenaires d'interaction, son activité kinase et son état de phosphorylation aux diverses étapes de la reproduction.

Même si les connaissances actuelles sur le guidage demeurent limitées sur plusieurs niveaux, nous savons cependant que les tubes polliniques reçoivent de multiples signaux spécifiques au stade de développement lors de la phase sporophytiques et qu'ils deviennent spécifiques à l'espèce lors des dernières étapes d'attraction. Présentement, notre étude sur le guidage des tubes polliniques repose, entre autre, sur l'hypothèse d'un attractant de nature protéique ou peptidique. En se basant sur la sécrétion et la glycosylation, nous avons été en mesure d'extraire différentes fractions protéiques des ovules du contrôle ScG4. Nous pourrions ainsi approfondir notre travail en testant ces extraits dans le système semi-*in vivo* décrit dans ce présent travail ou lors de tests *in vitro*. D'ailleurs, comme mentionné précédemment, l'étude récente portant sur les polypeptides LURES les considèrent comme des candidats potentiels d'attractant chez *Torenia fournieri* (Okuda et al., 2009). Comme pour les différents systèmes d'auto-incompatibilité, il est fort probable que différentes familles de plantes aient recruté des peptides ou des protéines différentes pour créer un gradient permettant le ciblage des tubes polliniques. Nous estimons donc que les chances sont élevées pour que le système utilisé chez les Solanacées soit différent de celui exprimé chez les Scrophularacées, famille dont fait partie *Torenia fournieri*. Dans la même optique,

le pyroséquençage du transcriptome de l'ovule des lignées mutantes de *ScFRK1* et du témoin *ScG4* de même que l'étude de leur phosphoprotéome pourront éventuellement permettre d'identifier des gènes candidats impliqués dans le guidage des tubes polliniques ainsi que les voies de signalisation impliquées. Dans ce dernier cas, les données de la protéomique seront par la suite confrontées à des résultats biologiques.

Le défaut lors du développement des grains de pollen peut être sporophytique ou gamétophytique. Des études sur la transmission du gène aux futures générations permettraient de faire la distinction entre les deux possibilités. Le croisement entre un plant mutant *Scfrk1* S1 et le pollen provenant du plant témoin ScV22 déterminerait si un tel croisement permet de restituer le phénotype type sauvage et de rétablir, en tout ou en partie, le niveau d'expression de *ScFRK1* dans la nouvelle génération mutante. Si le défaut est d'ordre gamétophytique, la transmission du gène aux générations successives sera grandement réduite, voire nulle (O'Brien et al., 2007), à moins que la plante issue d'un tel croisement soit à son tour silencieuse.

De plus, il serait intéressant de tester quel serait l'impact d'un ajout exogène d'hormones connues pour leur rôle dans le phénomène de parthénocarpie chez les Solanacées, comme par exemple l'auxine ou les gibbérélines (Gorguet et al., 2005; de Jong et al., 2009). Ceci permettra de déterminer l'interaction possible entre une voie de MAP kinase incluant *ScFRK1* sur la biosynthèse et/ou le catabolisme de ces hormones.

Bibliographie

- Acosta-Garcia, G., and Vielle-Calzada, J.P.** (2004). A classical arabinogalactan protein is essential for the initiation of female gametogenesis in *Arabidopsis*. *The Plant cell* **16**, 2614-2628.
- Alandete-Saez, M., Ron, M., and McCormick, S.** (2008). GEX3, Expressed in the Male Gametophyte and in the Egg Cell of *Arabidopsis thaliana*, Is Essential for Micropylar Pollen Tube Guidance and Plays a Role during Early Embryogenesis. *Mol Plant* **1**, 586-598.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J.** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research* **25**, 3389-3402.
- Atkinson, R.G., Bielecki, L.R.F., Gleave, A.P., Janssen, B.-J., and Morris, B.A.M.** (1998). Post-transcriptional silencing of chalcone synthase in petunia using a geminivirus-based episomal vector. *Plant J* **15**, 593-604.
- Baker, S.C., Robinson-Beers, K., Villanueva, J.M., Gaiser, J.C., and Gasser, C.S.** (1997). Interactions among genes regulating ovule development in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **145**, 1109-1124.
- Balbi, V., and Lomax, T.L.** (2003). Regulation of early tomato fruit development by the *diageotropica* gene. *Plant physiology* **131**, 186-197.
- Baldwin, B.G.** (1992). Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the compositae. *Molecular phylogenetics and evolution* **1**, 3-16.
- Becraft, P.W.** (2002). Receptor kinase signaling in plant development. *Annual review of cell and developmental biology* **18**, 163-192.
- Becraft, P.W., Stinard, P.S., and McCarty, D.R.** (1996). CRINKLY4: A TNFR-like receptor kinase involved in maize epidermal differentiation. *Science (New York, N.Y)* **273**, 1406-1409.
- Bergmann, D.C., Lukowitz, W., and Somerville, C.R.** (2004). Stomatal development and pattern controlled by a MAPKK kinase. *Science (New York, N.Y)* **304**, 1494-1497.
- Birnam, R.K., Laublin, G., and Cappadocia, M.** (1994). Genetic control of in vitro shoot regeneration from leaf explants in *Solanum chacoense* Bitt. *TAG. Theoretical and applied genetics* **88**, 535-540.
- Bohs, L., and Olmstead, R.G.** (1997). Phylogenetic relationships in *Solanum* (Solanaceae) based on *ndhF* sequences. *Systematic Botany* **22**, 5-17.

- Camadro, E.L., Carputo, D., and Peloquin, S.J.** (2004). Substitutes for genome differentiation in tuber-bearing Solanum: interspecific pollen-pistil incompatibility, nuclear-cytoplasmic male sterility, and endosperm. *TAG. Theoretical and applied genetics* **109**, 1369-1376.
- Capron, A., Gourgues, M., Neiva, L.S., Faure, J.E., Berger, F., Pagnussat, G., Krishnan, A., Alvarez-Mejia, C., Vielle-Calzada, J.P., Lee, Y.R., Liu, B., and Sundaresan, V.** (2008). Maternal Control of Male-Gamete Delivery in Arabidopsis Involves a Putative GPI-Anchored Protein Encoded by the LORELEI Gene. *The Plant cell* **20**, 3038-3049.
- Caron, S.** (2002). Caractérisation de protéines kinases exprimées au moment de la fécondation et de l'embryogenèse chez Solanum chacoense Bitt. (Montréal: Université de Montréal), pp. 102.
- Chen, Y.H., Li, H.J., Shi, D.Q., Yuan, L., Liu, J., Sreenivasan, R., Baskar, R., Grossniklaus, U., and Yang, W.C.** (2007). The central cell plays a critical role in pollen tube guidance in Arabidopsis. *The Plant cell* **19**, 3563-3577.
- Clark, S.E., Williams, R.W., and Meyerowitz, E.M.** (1997). The CLAVATA1 gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in Arabidopsis. *Cell* **89**, 575-585.
- Coimbra, S., Almeida, J., Junqueira, V., Costa, M.L., and Pereira, L.G.** (2007). Arabinogalactan proteins as molecular markers in Arabidopsis thaliana sexual reproduction. *J Exp Bot* **58**, 4027-4035.
- Correll, D.S.** (1962). *The Potato and Its Wild Relatives*. (Renner, Texas: Texas Research Foundation).
- Curtis, M.D., and Grossniklaus, U.** (2003). A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant physiology* **133**, 462-469.
- de Jong, M., Mariani, C., and Vriezen, W.H.** (2009). The role of auxin and gibberellin in tomato fruit set. *J Exp Bot* **60**, 1523-1532.
- Dnyansagar, V.R., and Cooper, D.C.** (1960). Development of the seed of Solanum phureja. *Am J Bot* **47**, 176-186.
- Dodds, P.N., Clarke, A.E., and Newbigin, E.** (1996). A molecular perspective on pollination in flowering plants. *Cell* **85**, 141-144.
- Dong, J., Kim, S.T., and Lord, E.M.** (2005). Plantacyanin plays a role in reproduction in Arabidopsis. *Plant physiology* **138**, 778-789.
- Douzery, E.J., Pridgeon, A.M., Kores, P., Linder, H.P., Kurzweil, H., and Chase, M.W.** (1999). Molecular phylogenetics of Deseae (Orchidaceae): a contribution from nuclear ribosomal ITS sequences. *Am J Bot* **86**, 887.
- Dresselhaus, T.** (2006). Cell-cell communication during double fertilization. *Current opinion in plant biology* **9**, 41-47.

- Dyer, A.F.** (1963). The use of lacto-propionic orcein in rapid squash methods for chromosome preparations. *Stain technology* **38**, 85-90.
- Esau, K.** (1977). *Anatomy of Seed Plants*, 2nd. (Santa Barbara).
- Escobar-Restrepo, J.M., Huck, N., Kessler, S., Gagliardini, V., Gheyselinck, J., Yang, W.C., and Grossniklaus, U.** (2007). The FERONIA receptor-like kinase mediates male-female interactions during pollen tube reception. *Science (New York, N.Y)* **317**, 656-660.
- Estrada-Luna, A.A., Garcia-Aguilar, M. and Vielle-Calzada, J.-P.** (2004). Female reproductive development and pollen tube growth in diploid genotypes of *Solanum cardiophyllum* Lindl. *Sex Plant Reprod* **17**, 117-124.
- Frankel, R., and Galun, E.** (1977). *Pollination mechanisms, reproduction, and plant breeding.* (Heidelberg: Springer-Verlag).
- Friedman, W.E., and Williams, J.H.** (2003). Modularity of the angiosperm female gametophyte and its bearing on the early evolution of endosperm in flowering plants. *Evolution; international journal of organic evolution* **57**, 216-230.
- Germain, H., Rudd, S., Zotti, C., Caron, S., O'Brien, M., Chantha, S.C., Lagace, M., Major, F., and Matton, D.P.** (2005). A 6374 unigene set corresponding to low abundance transcripts expressed following fertilization in *Solanum chacoense* Bitt, and characterization of 30 receptor-like kinases. *Plant molecular biology* **59**, 515-532.
- Gillaspy, G., Ben-David, H., and Gruissem, W.** (1993). Fruits: A Developmental Perspective. *The Plant cell* **5**, 1439-1451.
- Goetz, M., Hooper, L.C., Johnson, S.D., Rodrigues, J.C., Vivian-Smith, A., and Koltunow, A.M.** (2007). Expression of aberrant forms of AUXIN RESPONSE FACTOR8 stimulates parthenocarpy in *Arabidopsis* and tomato. *Plant physiology* **145**, 351-366.
- Gorguet, B., van Heusden, A.W., and Lindhout, P.** (2005). Parthenocarpic fruit development in tomato. *Plant biology (Stuttgart, Germany)* **7**, 131-139.
- Goring, D.R., Glavin, T.L., Schafer, U., and Rothstein, S.J.** (1993). An S receptor kinase gene in self-compatible *Brassica napus* has a 1-bp deletion. *The Plant cell* **5**, 531-539.
- Gray-Mitsumune, M., O'Brien, M., Bertrand, C., Tebbji, F., Nantel, A., and Matton, D.P.** (2006). Loss of ovule identity induced by overexpression of the fertilization-related kinase 2 (ScFRK2), a MAPKKK from *Solanum chacoense*. *J Exp Bot* **57**, 4171-4187.
- Gross-Hardt, R., Kagi, C., Baumann, N., Moore, J.M., Baskar, R., Gagliano, W.B., Jurgens, G., and Grossniklaus, U.** (2007). LACHESIS restricts gametic cell fate in the female gametophyte of *Arabidopsis*. *PLoS biology* **5**, e47.

- Grun, P.** (1961). Early stages in the formation of internal barriers to gene exchange between diploid species of *Solanum*. *Am J Bot* **48**, 79-89.
- Halevy, A.H., Whitehead, C.S., and Kofranek, A.M.** (1984). Does Pollination Induce Corolla Abscission of *Cyclamen* Flowers by Promoting Ethylene Production? *Plant physiology* **75**, 1090-1093.
- Hall, T.A.** (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucl Acids Symp Ser*, pp. 95-98.
- Hawkes, J.G.** (1962). Introgression in certain wild potato species. *Euphytica* **11**, 26-35.
- Hawkes, J.G., and Hjerting, J.P.** (1969). The potatoes of Argentina, Brazil, Paraguay, and Uruguay, a Biosystematic study. (London: Oxford University Press).
- Higashiyama, T.** (2002). The synergid cell: attractor and acceptor of the pollen tube for double fertilization. *Journal of plant research* **115**, 149-160.
- Higashiyama, T., Kuroiwa, H., Kawano, S., and Kuroiwa, T.** (1998). Guidance in vitro of the pollen tube to the naked embryo sac of *torenia fournieri*. *The Plant cell* **10**, 2019-2032.
- Higashiyama, T., Yabe, S., Sasaki, N., Nishimura, Y., Miyagishima, S., Kuroiwa, H., and Kuroiwa, T.** (2001). Pollen tube attraction by the synergid cell. *Science (New York, N.Y)* **293**, 1480-1483.
- Higashiyama, T., Inatsugi, R., Sakamoto, S., Sasaki, N., Mori, T., Kuroiwa, H., Nakada, T., Nozaki, H., Kuroiwa, T., and Nakano, A.** (2006). Species preferentiality of the pollen tube attractant derived from the synergid cell of *Torenia fournieri*. *Plant physiology* **142**, 481-491.
- Hirt, H.** (2000). MAP kinases in plant signal transduction. Results and problems in cell differentiation **27**, 1-9.
- Hiscock, S.J., and Allen, A.M.** (2008). Diverse cell signalling pathways regulate pollen-stigma interactions: the search for consensus. *The New phytologist*.
- Hua, Z., Fieldsb, A., and Koa, T.** (2008). Biochemical Models for S-RNase-Based Self-Incompatibility. *Mol Plant* **1**, 574-585.
- Huck, N., Moore, J.M., Federer, M., and Grossniklaus, U.** (2003). The Arabidopsis mutant *feronia* disrupts the female gametophytic control of pollen tube reception. *Development (Cambridge, England)* **130**, 2149-2159.
- Ingouff, M., Sakata, T., Li, J., Sprunck, S., Dresselhaus, T., and Berger, F.** (2009). The two male gametes share equal ability to fertilize the egg cell in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol* **19**, R19-20.
- Jan, V.V.S., Laublin, G., Birhman, R.K., and Cappadocia, M.** (1996). Genetic analysis of leaf explant regenerability in *Solanum chacoense*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **47**, 9-13.

- Jansky, S.H., Simon, R., and Spooner, D.M.** (2006). A Test of Taxonomic Predictivity: Resistance to White Mold in Wild Relatives of Cultivated Potato. *Crop Science* **46**, 2561-2570.
- Johnson, M.A., and Lord, E.** (2006). Extracellular Guidance Cues and Intracellular Signaling Pathways that Direct Pollen Tube Growth. In *The Pollen Tube*, Springer-Verlag, ed (Berlin Heidelberg: Plant Cell Monogr), pp. 223-242.
- Kapfer, C.** (2003). Caractérisation du rôle de la protéine kinase PRK1 dans la reproduction chez *Solanum chacoense* (Montréal: Université de Montréal), pp. 67.
- Kasahara, R.D., Portereiko, M.F., Sandaklie-Nikolova, L., Rabiger, D.S., and Drews, G.N.** (2005). MYB98 is required for pollen tube guidance and synergid cell differentiation in *Arabidopsis*. *The Plant cell* **17**, 2981-2992.
- Kim, S., Dong, J., and Lord, E.M.** (2004). Pollen tube guidance: the role of adhesion and chemotropic molecules. *Current topics in developmental biology* **61**, 61-79.
- Koltunow, A.M., and Grossniklaus, U.** (2003). Apomixis: a developmental perspective. *Annual review of plant biology* **54**, 547-574.
- Koncz, C., Chua, N.-H., and Schell, J.** (1992). *Methods in Arabidopsis Research* (River Edge, NJ: World Scientific Publishing).
- Labarca, C., and Loewus, F.** (1972). The Nutritional Role of Pistil Exudate in Pollen Tube Wall Formation in *Lilium longiflorum*: I. Utilization of Injected Stigmatic Exudate. *Plant physiology* **50**, 7-14.
- Lantin, S., O'Brien, M., and Matton, D.P.** (1999). Pollination, wounding and jasmonate treatments induce the expression of a developmentally regulated pistil dioxygenase at a distance, in the ovary, in the wild potato *Solanum chacoense* Bitt. *Plant molecular biology* **41**, 371-386.
- Lee, C.B., Page, L.E., McClure, B.A., and Holtsford, T.P.** (2008). Post-pollination hybridization barriers in *Nicotiana* section *Alatae*. *Sex Plant Reprod* **21**, 183-195.
- Lee, H.-S., Karunanandaa, B., McCubbin, A., Gilroy, S., and Kao, T.-h.** (1996). PRK1, a receptor-like kinase of *Petunia inflata*, is essential for postmeiotic development of pollen. *Plant J* **9**, 613-624.
- Lee, H.-S., Chung, Y.-Y., Das, C., Karunanandaa, B., Went, J.L.v., Mariani, C., and Kao, T.-H.** (1997). Embryo sac development is affected in *Petunia inflata* plants transformed with an antisense gene encoding the extracellular domain of receptor kinase PRK1 *Sex Plant Reprod* **10**, 341-350.
- Lee, J.H., and Cooper, D.C.** (1958). Seed development following hybridization between diploid *Solanum* species from Mexico, Central and South America. *Am J Bot*, 104-110.
- Lersten, N.R.** (2004). *Flowering plant embryology*. (Ames: Blackwell Publishing).

- Lin, Z., Alexander, L., Hackett, R., and Grierson, D.** (2008). LeCTR2, a CTR1-like protein kinase from tomato, plays a role in ethylene signalling, development and defence. *Plant J.*
- Liu, J.S., and Schardl, C.L.** (1994). A conserved sequence in internal transcribed spacer 1 of plant nuclear rRNA genes. *Plant molecular biology* **26**, 775-778.
- Lukowitz, W., Roeder, A., Parmenter, D., and Somerville, C.** (2004). A MAPKK kinase gene regulates extra-embryonic cell fate in Arabidopsis. *Cell* **116**, 109-119.
- Lush, W.M., Spurck, T., and Joosten, R.** (2000). Pollen Tube Guidance by the Pistil of a Solanaceous Plant. *Annals of Botany* **85**, 39-47.
- Luu, D.T., Qin, X., Laublin, G., Yang, Q., Morse, D., and Cappadocia, M.** (2001). Rejection of S-heteroallelic pollen by a dual-specific s-RNase in *Solanum chacoense* predicts a multimeric SI pollen component. *Genetics* **159**, 329-335.
- Ma, H.** (2005). Molecular genetic analyses of microsporogenesis and microgametogenesis in flowering plants. *Annual review of plant biology* **56**, 393-434.
- Maheshwari, P.** (1950). An introduction to the embryology of angiosperms. (New York: McGraw-Hill Book Co., Inc.).
- Martin, F.W.** (1959). Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. *Stain technology* **34**, 125-128.
- Marton, M.L., Cordts, S., Broadhvest, J., and Dresselhaus, T.** (2005). Micropylar pollen tube guidance by egg apparatus 1 of maize. *Science (New York, N.Y)* **307**, 573-576.
- Matton, D.P., Bertrand, C., Laublin, G., and Cappadocia, M.** (1998). Molecular aspects of self-incompatibility in tuber-bearing *Solanum* species. In Khurana, S.M. and R. Chandra (eds), *Comprehensive Potato Biotechnology* (New Delhi: Malhotra Publ.), pp. 97-114.
- Matton, D.P., Maes, O., Laublin, G., Xike, Q., Bertrand, C., Morse, D., and Cappadocia, M.** (1997). Hypervariable Domains of Self-Incompatibility RNases Mediate Allele-Specific Pollen Recognition. *The Plant cell* **9**, 1757-1766.
- Mazzucato, A., Taddei, A.R., and Soressi, G.P.** (1998). The parthenocarpic fruit (pat) mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) sets seedless fruits and has aberrant anther and ovule development. *Development (Cambridge, England)* **125**, 107-114.
- McCormick, S.** (1993). Male Gametophyte Development. *The Plant cell* **5**, 1265-1275.
- McCormick, S.** (2004). Control of male gametophyte development. *The Plant cell* **16 Suppl**, S142-153.
- Miller, J.T., and Spooner, D.M.** (1996). Introgression of *Solanum chacoense* (*Solanum* sect. *Petota*): Upland populations reexamined. *Systematic Botany* **21**, 461-475.

- Mizuno, S., Osakabe, Y., Maruyama, K., Ito, T., Osakabe, K., Sato, T., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2007). Receptor-like protein kinase 2 (RPK 2) is a novel factor controlling anther development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **50**, 751-766.
- Müller, K.** (2006). Incorporating information from length-mutational events into phylogenetic analysis. *Molecular phylogenetics and evolution* **38**, 667-676.
- Nettancourt, D.d.** (2001). *Incompatibility and Incongruity in Wild and Cultivated Plants*. (New York: Springer).
- Nettancourt, D.d., and Eriksson, G.** (1968). Effects of irradiation upon starch formation and starch hydrolysis in tomato microspores. *Hereditas* **60**, 167-176.
- Nettancourt, D.d., and Dijkstra, M.** (1969). Starch accumulation in the microspores of a solanum species and possible implications in mutation breeding *American Journal of Potato Research* **46**, 239-242.
- O'Brien, M., Gray-Mitsumune, M., Kapfer, C., Bertrand, C., and Matton, D.P.** (2007). The ScFRK2 MAP kinase kinase kinase from *Solanum chacoense* affects pollen development and viability. *Planta* **225**, 1221-1231.
- O'Neill, S.D., Nadeau, J.A., Zhang, X.S., Bui, A.Q., and Halevy, A.H.** (1993). Interorgan regulation of ethylene biosynthetic genes by pollination. *The Plant cell* **5**, 419-432.
- Okuda, S., Tsutsui, H., Shiina, K., Sprunck, S., Takeuchi, H., Yui, R., Kasahara, R.D., Hamamura, Y., Mizukami, A., Susaki, D., Kawano, N., Sakakibara, T., Namiki, S., Itoh, K., Otsuka, K., Matsuzaki, M., Nozaki, H., Kuroiwa, T., Nakano, A., Kanaoka, M.M., Dresselhaus, T., Sasaki, N., and Higashiyama, T.** (2009). Defensin-like polypeptide LUREs are pollen tube attractants secreted from synergid cells. *Nature* **458**, 357-361.
- Olimpieri, I., Siligato, F., Caccia, R., Mariotti, L., Ceccarelli, N., Soressi, G.P., and Mazzucato, A.** (2007). Tomato fruit set driven by pollination or by the parthenocarpic fruit allele are mediated by transcriptionally regulated gibberellin biosynthesis. *Planta* **226**, 877-888.
- Pagnussat, G.C., Yu, H.J., and Sundaresan, V.** (2007). Cell-fate switch of synergid to egg cell in *Arabidopsis eostre* mutant embryo sacs arises from misexpression of the BEL1-like homeodomain gene BLH1. *The Plant cell* **19**, 3578-3592.
- Pagnussat, G.C., Yu, H.J., Ngo, Q.A., Rajani, S., Mayalagu, S., Johnson, C.S., Capron, A., Xie, L.F., Ye, D., and Sundaresan, V.** (2005). Genetic and molecular identification of genes required for female gametophyte development and function in *Arabidopsis*. *Development (Cambridge, England)* **132**, 603-614.
- Palanivelu, R., and Preuss, D.** (2006). Distinct short-range ovule signals attract or repel *Arabidopsis thaliana* pollen tubes in vitro. *BMC plant biology [electronic resource]* **6**, 7.

- Palanivelu, R., Brass, L., Edlund, A.F., and Preuss, D.** (2003). Pollen tube growth and guidance is regulated by POP2, an Arabidopsis gene that controls GABA levels. *Cell* **114**, 47-59.
- Prado, A.M., Colaço, R., Moreno, N., Silva, A.C., and Feijò, J.A.** (2008). Targeting of Pollen Tubes to Ovules Is Dependent on Nitric Oxide (NO) Signaling. *Mol Plant* **1**, 703-714.
- Punwani, J.A., and Drews, G.N.** (2008). Development and function of the synergid cell. *Sex Plant Reprod* **21**, 7-15.
- Punwani, J.A., Rabiger, D.S., and Drews, G.N.** (2007). MYB98 positively regulates a battery of synergid-expressed genes encoding filiform apparatus localized proteins. *The Plant cell* **19**, 2557-2568.
- Ray, S.M., Park, S.S., and Ray, A.** (1997). Pollen tube guidance by the female gametophyte. *Development (Cambridge, England)* **124**, 2489-2498.
- Rea, A.C., and Nasrallah, J.B.** (2008). Self-incompatibility systems: barriers to self-fertilization in flowering plants. *The International journal of developmental biology* **52**, 627-636.
- Rees-Leonard, O.L.** (1935). Macrosporogenesis and Development of the Macrogametophyte of *Solanum tuberosum* *Botanical Gazette* **96**, 734-750.
- Regan, S.M., and Moffatt, B.A.** (1990). Cytochemical Analysis of Pollen Development in Wild-Type Arabidopsis and a Male-Sterile Mutant. *The Plant cell* **2**, 877-889.
- Reiser, L., and Fischer, R.L.** (1993). The Ovule and the Embryo Sac. *The Plant cell* **5**, 1291-1301.
- Rotman, N., Rozier, F., Boavida, L., Dumas, C., Berger, F., and Faure, J.E.** (2003). Female control of male gamete delivery during fertilization in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol* **13**, 432-436.
- Russell, S.D.** (1985). Preferential fertilization in *Plumbago*: Ultrastructural evidence for gamete-level recognition in an angiosperm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**, 6129-6132.
- Sall, J.** (2005). JMP 8: JMP® Statistical Discovery Software. In SAS Institute (Carey, N.C.).
- Sambrook, J., E.F., F., and T., M.** (1989). *Molecular Cloning, a laboratory manual*, second ed. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sandaklie-Nikolova, L., Palanivelu, R., King, E.J., Copenhaver, G.P., and Drews, G.N.** (2007). Synergid cell death in Arabidopsis is triggered following direct interaction with the pollen tube. *Plant physiology* **144**, 1753-1762.
- Scott, R.J., Spielman, M., Bailey, J., and Dickinson, H.G.** (1998). Parent-of-origin effects on seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Development (Cambridge, England)* **125**, 3329-3341.

- Scott, R.J., Armstrong, S.J., Doughty, J., and Spielman, M.** (2008). Double Fertilization in *Arabidopsis thaliana* Involves a Polyspermy Block on the Egg but Not the Central Cell. *Mol Plant* **1**, 611-619.
- Shimizu, K.K., and Okada, K.** (2000). Attractive and repulsive interactions between female and male gametophytes in *Arabidopsis* pollen tube guidance. *Development (Cambridge, England)* **127**, 4511-4518.
- Shimizu, K.K., Ito, T., Ishiguro, S., and Okada, K.** (2008). MAA3 (MAGATAMA3) helicase gene is required for female gametophyte development and pollen tube guidance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant & cell physiology* **49**, 1478-1483.
- Simmons, M.P., and Ochoterena, H.** (2000). Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analyses. *Systematic biology* **49**, 369-381.
- Spooner, D.M., Fajardo, D., and Bryan, G.J.** (2007). Species limits of *Solanum berthaultii* Hawkes and *S. tarijense* Hawkes and the implications for species boundaries in *Solanum* sect. *Petota*. *Taxon* **56**, 987-999.
- Spooner, D.M., Bamberg, J., van den Berg, R.G., Rodríguez, A., and Hijmans, R.J.** (2004). Wild potatoes (*Solanum* section *Petota*; *Solanaceae*) of North and Central America (Ann Arbor, MI: American Society of Plant Taxonomists).
- Spooner, D.M., Rodriguez, F., Polgar, Z., Ballard, H.E., and Jansky, S.H.** (2008). Genomic Origins of Potato Polyploids : GBSSI Gene Sequencing Data. *Crop science* **48**.
- Sugiura, M.** (1992). The chloroplast genome. *Plant molecular biology* **19**, 149-168.
- Summers, D., and Grun, P.** (1981). Reproductive isolation barriers to gene exchange between *Solanum chacoense* and *Solanum commersonii* (*Solanaceae*). *Am J Bot* **68**, 1240-1248.
- Swanson, R., Edlund, A.F., and Preuss, D.** (2004). Species specificity in pollen-pistil interactions. *Annual review of genetics* **38**, 793-818.
- Swofford, D.L.** (2003). PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony, v.4.0. In Sinauer Associates (Sunderland, Massachusetts).
- Tanaka, H., Watanabe, M., Watanabe, D., Tanaka, T., Machida, C., and Machida, Y.** (2002). ACR4, a putative receptor kinase gene of *Arabidopsis thaliana*, that is expressed in the outer cell layers of embryos and plants, is involved in proper embryogenesis. *Plant & cell physiology* **43**, 419-428.
- Vivian-Smith, A., Luo, M., Chaudhury, A., and Koltunow, A.** (2001). Fruit development is actively restricted in the absence of fertilization in *Arabidopsis*. *Development (Cambridge, England)* **128**, 2321-2331.
- Volkov, R.A., Komarova, N.Y., Panchuk, II, and Hemleben, V.** (2003). Molecular evolution of rDNA external transcribed spacer and phylogeny of sect. *Petota* (genus *Solanum*). *Molecular phylogenetics and evolution* **29**, 187-202.

- Voronin, V., Aionesei, T., Limmongkon, A., Barinova, I., Touraev, A., Lauriere, C., Coronado, M.J., Testillano, P.S., Risueno, M.C., Heberle-Bors, E., and Wilson, C.** (2004). The MAP kinase kinase NtMEK2 is involved in tobacco pollen germination. *FEBS letters* **560**, 86-90.
- Walker, R.I.** (1955). Cytological and embryological studies in *Solanum*, Section *Tuberarium*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* **82**, 87-101.
- Wang, H., Liu, Y., Bruffett, K., Lee, J., Hause, G., Walker, J.C., and Zhang, S.** (2008). Haplo-insufficiency of MPK3 in MPK6 mutant background uncovers a novel function of these two MAPKs in *Arabidopsis* ovule development. *The Plant cell* **20**, 602-613.
- Wassarman, P.M., Jovine, L., and Litscher, E.S.** (2001). A profile of fertilization in mammals. *Nature cell biology* **3**, E59-64.
- Weigel, D., and Glazebrook, J.** (2002). *Arabidopsis, A Laboratory Manual*. (New York: Cold Spring Harbor).
- Wolters-Arts, M., Lush, W.M., and Mariani, C.** (1998). Lipids are required for directional pollen-tube growth. *Nature* **392**, 818-821.
- Wu, H.M., Wang, H., and Cheung, A.Y.** (1995). A pollen tube growth stimulatory glycoprotein is deglycosylated by pollen tubes and displays a glycosylation gradient in the flower. *Cell* **82**, 395-403.
- Yang, K.Y., Liu, Y., and Zhang, S.** (2001). Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway is involved in disease resistance in tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 741-746.
- Zhang, T., Liu, Y., Yang, T., Zhang, L., Xu, S., Xue, L., and An, L.** (2006). Diverse signals converge at MAPK cascades in plant. *Plant Physiol Biochem* **44**, 274-283.
- Zhang, X.S., and O'Neill, S.D.** (1993). Ovary and Gametophyte Development Are Coordinately Regulated by Auxin and Ethylene following Pollination. *The Plant cell* **5**, 403-418.
- Zinkl, G.M., Zwiebel, B.I., Grier, D.G., and Preuss, D.** (1999). Pollen-stigma adhesion in *Arabidopsis*: a species-specific interaction mediated by lipophilic molecules in the pollen exine. *Development (Cambridge, England)* **126**, 5431-5440.

Annexe 1

USDA, ARS, Department of agriculture
 Potato Introduction Project
 4312 Hwy 42
 Sturgeon Bay, Wisconsin
 United States, 54235

Species	Accession	Plantid	Origin
<i>Solanum bulbocastanum</i>	(S1) PI 275188	HAW 1585	Mexico, Mexico
	(S2) PI 545751	TRHRG 237	Mexico, Jalisco
<i>Solanum commersonii</i> subsp. <i>commersonii</i>	(S3) PI 472837	OKA 5174 X 5207	Argentina
	(S4) PI 558050	BRU 020	Argentina
<i>Solanum microdontum</i>	(S5) PI 473171	OKA 5623	Argentina
	(S6) PI 500041	OKA 7658	Argentina, Salta
<i>Solanum pinnatisectum</i>	(S7) PI 275236	HAW 1505	Mexico, Jalisco
	(S8) PI 347766	TRN 205A	Mexico, Guanajuato
<i>Solanum tarijense</i>	(S11) PI 473336	HHCH 4574	Bolivia, Potosi
	(S12) PI 473243	OKA 6238	Argentina
	(S13) PI 195206	CPC 1727.3	Bolivia, Chuquisaca
<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>andigenum</i>	(S9) PI 281034	WAC 911	Mexico
	(S10) PI 546023	HOHL 253	Bolivia, Potosi

PI : Plant Introduction

Chiltern Seeds
 Bortree Stile, Ulverston, Cumbria
 LA12 7PB, England

Specie	Catalog	Origin
<i>Solanum lycopersicum</i> (<i>Lycopersicon esculentum</i>) var. <i>Ailsa Craig</i> (Heirloom Variety)	1803	Mediterranean

Annexe 2

Spécimens d'herbier

Espèce	# Accession ou cultivar	# Récolte
<i>Solanum bulbocastanum</i> (S1)	PI 275188	08-1
<i>Solanum bulbocastanum</i> (S2)	PI 545751	08-2
<i>Solanum commersonii</i> (S3)	PI 472837	08-3
<i>Solanum commersonii</i> (S4)	PI 558050	08-4
<i>Solanum microdontum</i> (S5)	PI 473171	08-5
<i>Solanum microdontum</i> (S6)	PI 500041	08-6
<i>Solanum pinnatisectum</i> (S7)	PI 275236	08-7
<i>Solanum pinnatisectum</i> (S8)	PI 347766	08-8
<i>Solanum tuberosum</i> (S9)	PI 281034	08-9
<i>Solanum tuberosum</i> (S10)	PI 546023	08-10
<i>Solanum tarijense</i> (S11)	PI 473336	08-11
<i>Solanum tarijense</i> (S12)	PI 473243	08-12
<i>Solanum tarijense</i> (S13)	PI 195206	08-13
<i>Solanum lycopersicum</i>	Ailsa Craig	08-14
<i>Capsicum annuum</i>	Early Sunstation	08-15
<i>Helianthus annuus</i>	Ranger	08-16
<i>Physalis pruinosa</i>	Aunt Molly's	08-17
<i>Solanum lycopersicum</i>	Lemon Boy	08-18
<i>Nicotiana tabacum</i>	Zimmer Spanish	08-19
<i>Ipomea batatas</i>		08-20
<i>Solanum chacoense</i>	GFP	08-21
<i>Solanum chacoense</i>	frk1 AS13	08-22
<i>Solanum chacoense</i>	frk1 S1	08-23
<i>Solanum chacoense</i>	frk1 S27	08-24
<i>Solanum chacoense</i>	G4	08-25
<i>Solanum chacoense</i>	V22	08-26
<i>Solanum chacoense</i>	582	08-27
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Columbia	08-28
<i>Solanum melongena</i>	Black Bell	08-29

La description détaillée de chaque spécimen se retrouve sur les étiquettes de la base de données de l'herbier.

Spécimens Genbank

(www.ncbi.nlm.nih.gov)

Espèce	# accession Genbank
<i>Solanum commersonii</i> subsp. <i>malmeanum</i>	AY875772
<i>Solanum tarijense</i>	AY875812

Annexe 3

Figure 21 : *Solanum lycopersicum* (*Lycopersicon esculentum*) var. *Ailsa Craig*. **A** Représentation schématique. **B-D** Feuilles, fleurs et fruits respectivement de *S. lycopersicum* var. *Ailsa Craig*. Échelle 1 cm.

Représentation tirée du site Australian National
Botanic Gardens
(www.anbg.gov.au/poison-plants/L-poison.html)

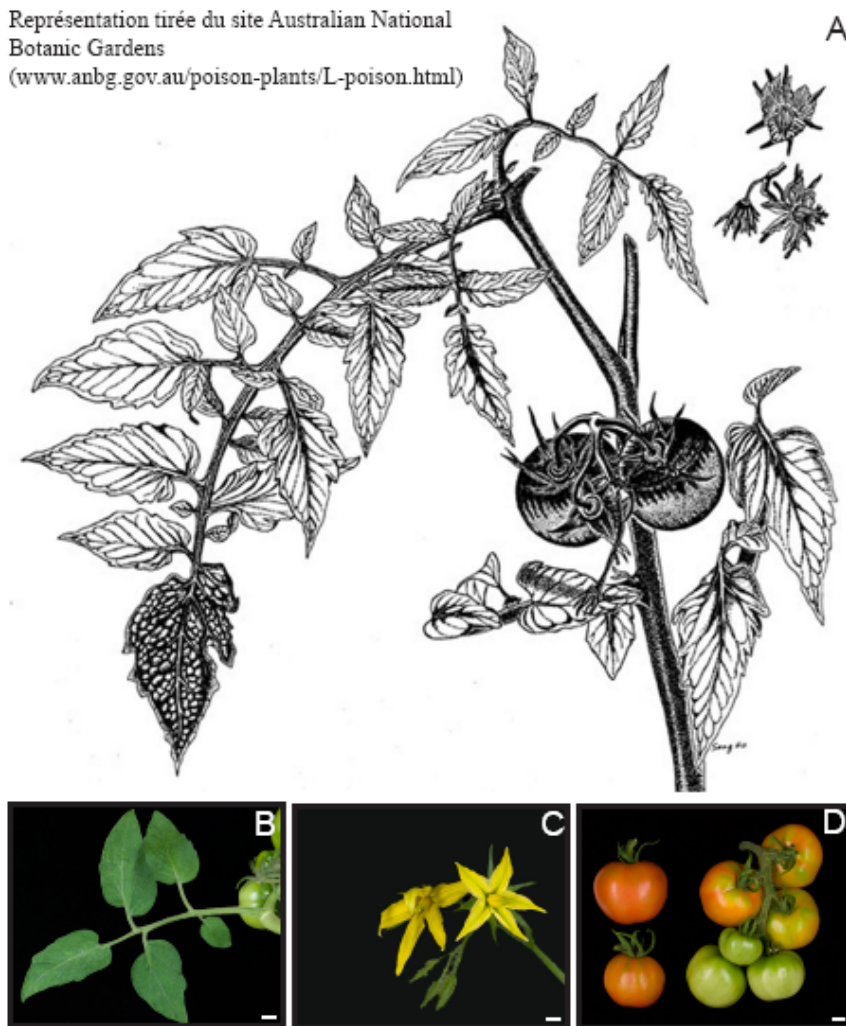


Figure 22 : *Solanum bulbocastanum*. A Représentation schématique. B-D Feuilles, fleurs et fruits respectivement de *S. bulbocastanum* PI 275188 (S1). E-G Feuilles, fleurs et fruits respectivement de *S. bulbocastanum* PI 545751 (S2). Échelle 1 cm.

Représentation tirée de Correll, 1962

A

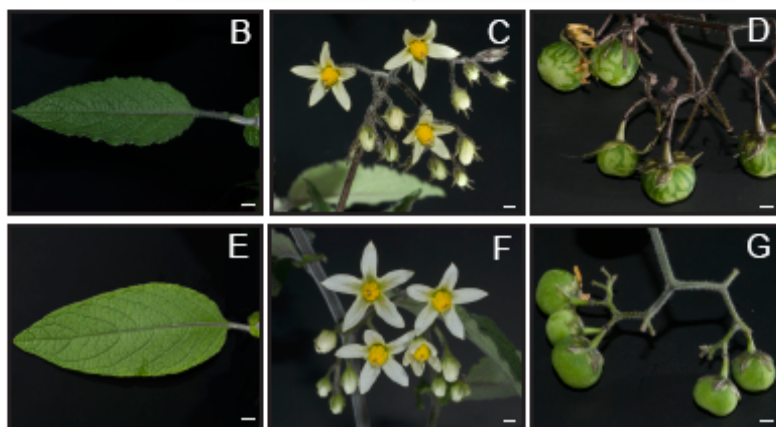


Figure 23 : *Solanum chacoense*. A Représentation schématique. B-D Feuilles, fleurs et fruits respectivement de *S. chacoense*, génotype ScG4. Échelle 1 cm.

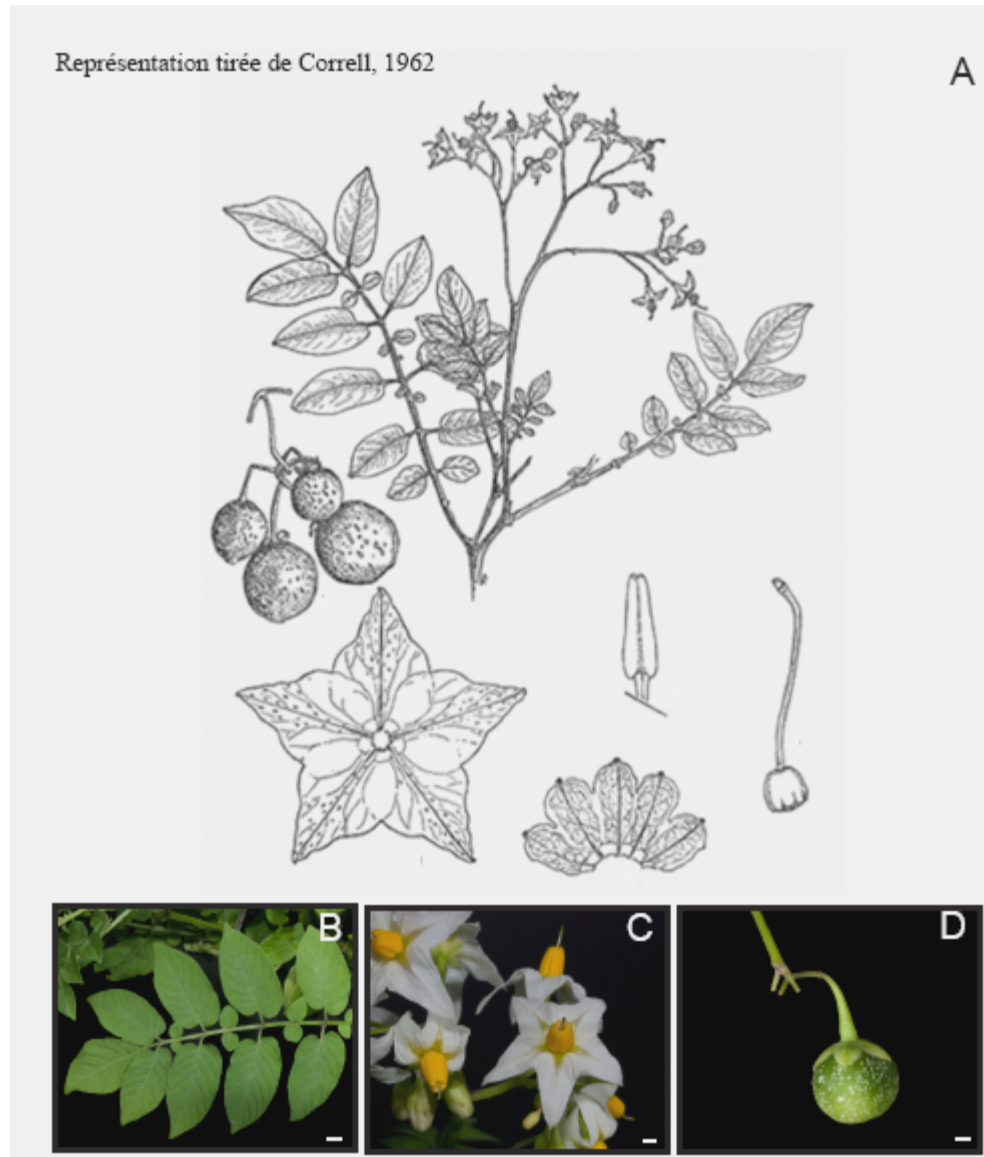


Figure 24 : *Solanum commersonii* subsp. *commersonii*. A Représentation schématique. B-D Feuilles, fleurs et fruits respectivement de *S. commersonii* PI 472837 (S3). E-G Feuilles, fleurs et fruits respectivement de *S. commersonii* PI 558050 (S4). Échelle 1 cm.

Représentation tirée de Correll, 1692

A



Figure 25 : *Solanum microdontum*. A Représentation schématique. B-D Feuilles, fleurs et fruits respectivement de *S. microdontum* PI 473171 (S5). E-G Feuilles, fleurs et fruits respectivement de *S. microdontum* PI 500041 (S6). Échelle 1 cm.

Représentation tirée de Correll, 1962

A

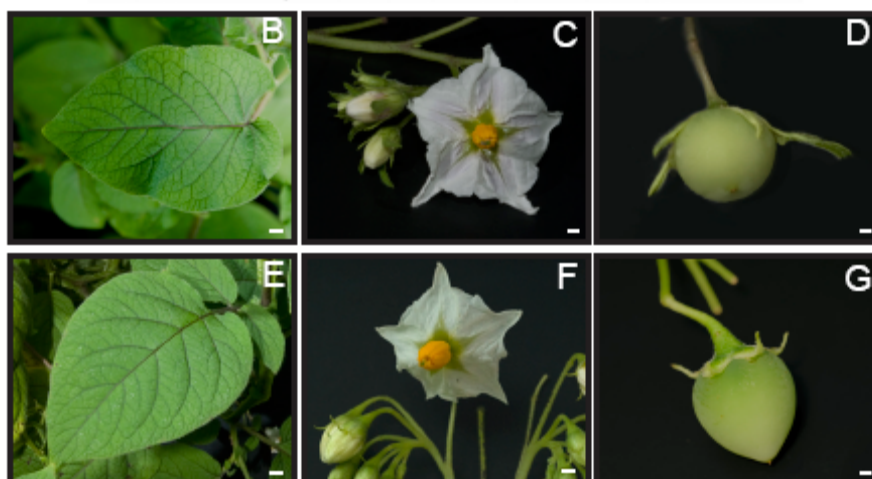


Figure 26 : *Solanum pinnatisectum*. A Représentation schématique. B-D Feuilles, fleurs et fruits respectivement de *S. pinnatisectum* PI 275236 (S7). E-G Feuilles, fleurs et fruits respectivement de *S. pinnatisectum* PI 347766 (S8). Échelle 1 cm.

Représentation tirée de Correll, 1962

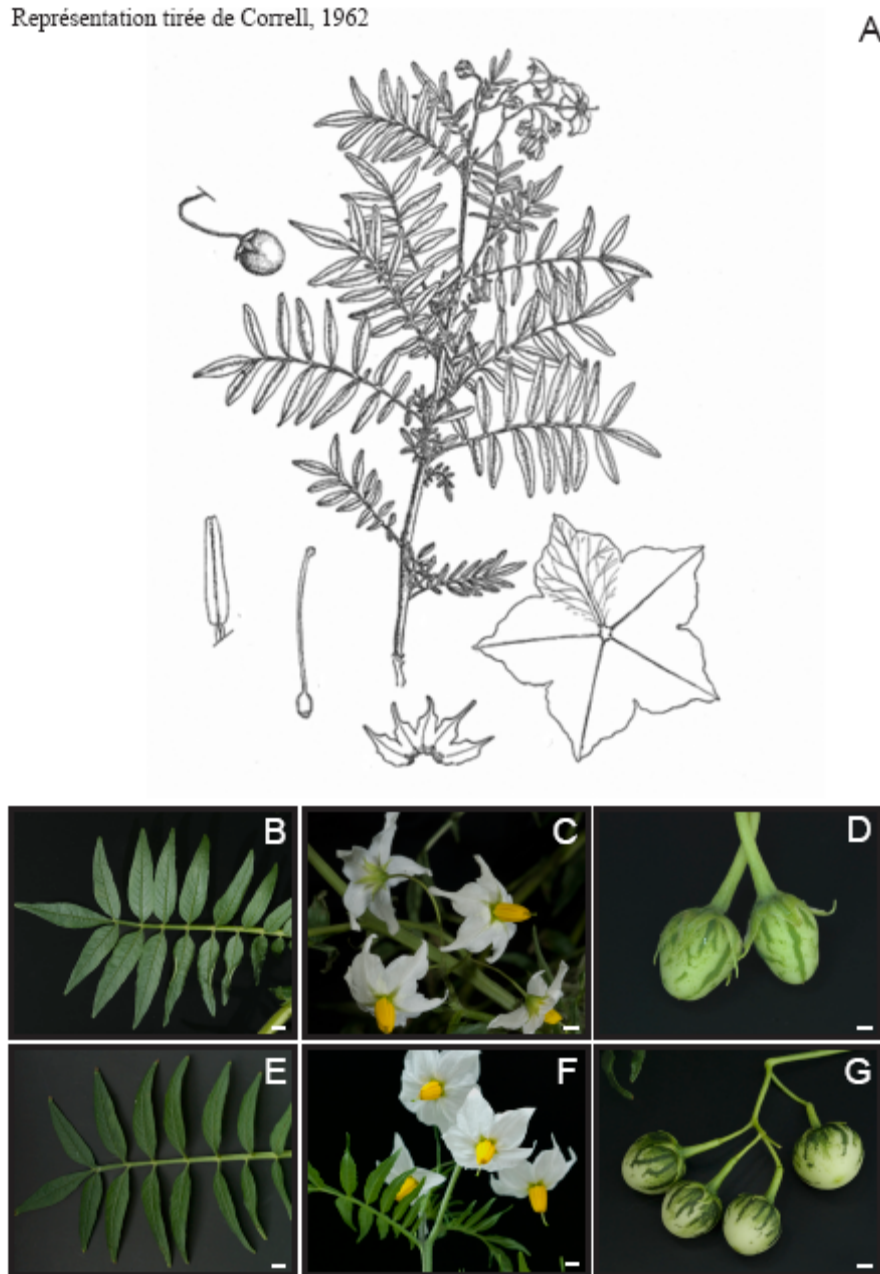


Figure 27 : *Solanum tarijense*. A Représentation schématique. B-D Feuilles, fleurs et fruits respectivement de *S. tarijense* PI 473336 (S11). E-G Feuilles, fleurs et fruits respectivement de *S. tarijense* PI 473243 (S12). Échelle 1 cm. L'accession PI 195206, nommée arbitrairement S13, a également été utilisée, mais elle est non représentée.

Représentation tirée de Correll, 1962

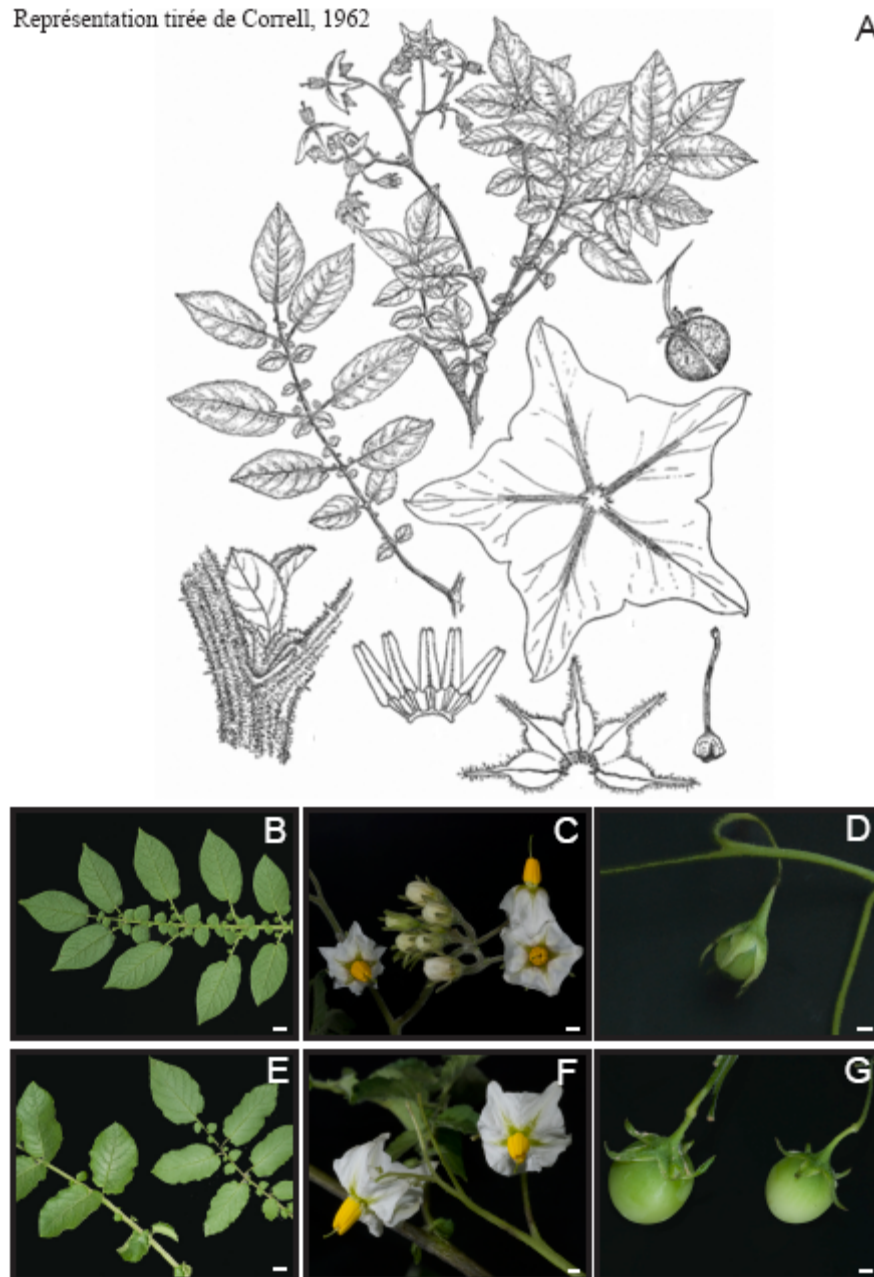


Figure 28 : *Solanum tuberosum* subsp. *andigenum*. A Représentation schématique. B-D Feuilles, fleurs et fruits respectivement de *S. tuberosum* PI 281034 (S9). E-G Feuilles, fleurs et fruits respectivement de *S. tuberosum* PI 546023 (S10). Échelle 1 cm.

