

Université de Montréal

# Destinée des S-RNases dans les tubes polliniques lors des croisements compatibles et incompatibles

par  
Nicolas Boivin

Département de sciences biologiques, Institut de Recherche en Biologie Végétal  
Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté à la Faculté des arts et des sciences  
en vue de l'obtention du grade de maîtrise  
en sciences biologiques

Août, 2013

© Nicolas Boivin, 2013

## Résumé

L'auto-incompatibilité (AI) est la capacité génétiquement déterminée d'une plante fertile de rejeter son propre pollen. Chez les Solanacées l'AI dépend des éléments d'un locus fort complexe (locus S) multigénique. L'élément du locus-S exprimé dans le pistil est une ribonucléase (S-RNase) dont le rôle est de dégrader l'ARN chez le pollen *self*, tandis que l'élément du locus S exprimé dans le pollen est un ensemble de protéines du type F-box, qui sont normalement impliquées dans la dégradation des protéines. Cependant, comment les S-RNases *self* restent actives lors des croisements incompatibles et comment les S-RNases non-*self* sont inactivées lors des croisements compatibles ce n'est encore pas clair. Un modèle propose que les S-RNases non-*self* soient dégradées lors des croisements compatibles. Un autre modèle propose que toutes les S-RNases, *self* et non-*self*, soient d'abord séquestrées à l'intérieur d'une vacuole, et elles y resteraient lors des croisements compatibles. Lors de croisements incompatibles, par contre, elles seraient relâchées dans le cytoplasme, où elles pourront exercer leur action cytotoxique. Notre étude tente de répondre à ces questions. Notamment, nous cherchons à mettre en évidence la localisation vacuolaire et/ou cytoplasmique des S-RNases et leur concentration par immunolocalisation, en utilisant un anticorps ciblant la S<sub>11</sub>-RNase de *Solanum chacoense* et la microscopie électronique à transmission. Nos résultats montrent que la densité de marquage observée pour les S-RNases cytoplasmiques est significativement plus haute dans les tubes incompatibles que dans ceux compatibles ce qui nous indique que pour qu'un tube pollinique soit compatible il doit contenir une faible densité de S-RNase cytoplasmique.

## Summary

Self-incompatibility (SI) is a widespread genetic device used by flowering plants to reject their own pollen, and thus to avoid inbreeding. This cell-cell recognition mechanism is mediated by molecular interactions between gene products expressed in the pollen and those expressed in specialized cells of the pistil. The genetic determinants of the system are produced from a highly complex multigenic S-locus with multiple S-haplotypes, although other genes outside the S-locus also contribute to the phenomenon in a non-allele specific manner. SI discriminates between self and non-self pollen, as the former will be rejected (incompatible cross), whereas the latter will be allowed to accomplish fertilization (compatible cross). In the Solanaceae (to which *Solanum chacoense* belongs) the pistillar determinant to SI is an extremely polymorphic stylar extracellular S-RNase, whereas the pollen determinant involves the collaborative action of several members of the F-box family (SLF or S-locus F-box). This has led to the hypothesis that during compatible crosses, ubiquitin-mediated degradation of non-self S-RNases takes place (degradation model). However, it has also been found that non-self S-RNases appear to be sequestered in the vacuole during compatible crosses (sequestration model). The objective of our study was to discriminate between these two models by using immunolocalization techniques and transmission electron microscopy. We have found that the concentration of S-RNases is significantly higher in incompatible pollen tubes than in compatible ones.

**Mots-clés** : Auto-incompatibilité gamétophytique, *Solanum chacoense*, S-RNase, protéine F-box du Locus-S (SLF), tube pollinique, immunohistochimie, dégradation protéique, accumulation de S-RNase.

### Abréviations :

**AI** : Auto-incompatibilité

**S-RNase** : Ribonucléase du locus-S

**SLF** : Protéine F-box du locus-S

**C1, C2, etc.** : Régions conservées de la S-RNase

**HVa et HVb** : Régions hypervariables de la S-RNase

**cm** : centimètre

**h** : heure

**hpp** : heures post-pollinisation

**µm<sup>2</sup>** : micromètre carré

**TT** : Cellule du tissu de transmission

**O** : Ovaire

**S** : Stigmate pollinique

**TP** : Tube pollinique

**PE** : Paroi externe du tube pollinique

**PI** : Paroi interne du tube pollinique

**RTP** : Résidu de Tube

# Table des matières

<b>1. INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 À PROPOS DE L'INCOMPATIBILITÉ GAMÉTOPHYTIQUE DE <i>S. CHACOENSE</i>.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 <i>Contexte et Définition.....</i>	1
1.1.2 <i>Les composantes styleaire et pollinique de l'incompatibilité chez <i>S. chacoense</i>.....</i>	3
1.1.3 <i>Modèles pour l'auto-incompatibilité basée sur la S-RNase.....</i>	6
<b>1.2 MORPHOLOGIE DU STYLE ET DES TUBES POLLINIQUES CHEZ <i>S. CHACOENSE</i>.....</b>	<b>14</b>
1.2.1 <i>Morphologie du style.....</i>	14
1.2.2 <i>Morphologie du tube pollinique.....</i>	15
1.2.3 <i>Différence de morphologie entre tubes polliniques compatibles et incompatibles.....</i>	23
<b>2. MATÉRIELS ET MÉTHODES.....</b>	<b>25</b>
2.1 DESCRIPTION DU MATÉRIEL BIOLOGIQUE.....	25
2.2 PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS.....	25
2.3 MICROSCOPIE À FLUORESCENCE.....	25
2.3.1 <i>Fixation au Carnoy.....</i>	25
2.3.2 <i>Observations par microscopie à fluorescence.....</i>	26
2.4 MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE À TRANSMISSION.....	26
2.4.1 <i>Fixation au formaldéhyde.....</i>	26
2.4.2 <i>Déshydratation et enrobage au LR-White.....</i>	26
2.4.3 <i>Coupe des échantillons.....</i>	27
2.4.4 <i>Immunomarquage de la S-RNase et de la callose.....</i>	27
2.4.5 <i>Observation des coupes au microscope électronique à transmission.....</i>	28
2.4.6 <i>Les tests statistiques.....</i>	28
<b>3. RÉSULTATS.....</b>	<b>29</b>
3.1 CINÉTIQUE DE CROISSANCE DES TUBES POLLINIQUES.....	29
3.2 MORPHOLOGIE DU TISSU DE TRANSMISSION ENVAHI PAR LES TUBES POLLINIQUES.....	31
3.3 DIFFÉRENTES MORPHOLOGIES DES TUBES POLLINIQUES.....	32
3.4 DENSITÉ DE LA S-RNASE DANS LES DIFFÉRENTES RÉGIONS DU TISSU DE TRANSMISSION.....	38
3.5 DENSITÉ DE LA S-RNASE DANS LES DIFFÉRENTS ESPACES DU TUBE POLLINIQUE.....	39
<b>4. DISCUSSION.....</b>	<b>43</b>
4.1 L'ENVIRONNEMENT DES TUBES POLLINIQUES.....	43
4.2 INTERNALISATION DES S-RNASES PAR LES TUBES POLLINIQUES.....	43
4.2.1 <i>Les S-RNases vacuolaires.....</i>	43
4.2.2 <i>Séquestration des S-RNase.....</i>	44
4.3 LES S-RNASES CYTOPLASMIQUES : VÉRITABLES AGENTS DE L'AUTO-INCOMPATIBILITÉ.....	45
<b>5. CONCLUSIONS.....</b>	<b>47</b>

## Liste des tableaux

1- PRÉSENCE PRÉVUE DES S-RNASES DANS LES COMPARTIMENTS DU TUBE POLLINIQUE SELON LE TYPE DE CROISEMENT ET LE MODÈLE CONSIDÉRÉ.....	24
---	----

## Liste des figures

1- MODÈLE DE LA DÉGRADATION DES S-RNASES .....	7
2- MODÈLE DE LA SÉQUESTRATION DES S-RNASES .....	10
3- MODÈLE PROPOSÉ PAR CETTE ÉTUDE.....	13
4- REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE D'UN TUBE POLLINIQUE.....	17
5- PHOTOGRAPHIE D'UN STYLE ENVAHIT PAR DES TUBES POLLINIQUES COMPATIBLES.....	18
6- PHOTOGRAPHIE D'UN STYLE ENVAHIT PAR DES TUBES POLLINIQUES INCOMPATIBLES.....	19
7- CROISSANCE DE TUBES POLLINIQUES DE <i>SOLANUM CHACOENSE</i> EN FONCTION DU TEMPS .....	30
8- MICROGRAPHIE D'UNE COUPE TRANSVERSALE D'UN STYLE DE <i>SOLANUM CHACOENSE</i> .....	33
9- COUPE TRANSVERSALE D'UN STYLE 18H APRÈS UNE POLLINISATION COMPATIBLE .....	34
10- COUPE TRANSVERSALE D'UN STYLE 24H APRÈS UNE POLLINISATION COMPATIBLE .....	35
11- COUPE TRANSVERSALE D'UN STYLE 18H APRÈS UNE POLLINISATION INCOMPATIBLE .....	36
12- COUPE TRANSVERSALE D'UN STYLE 24H APRÈS UNE POLLINISATION INCOMPATIBLE .....	37
13- DENSITÉ DE S <sub>11</sub> -RNASE AU NIVEAU DE TROIS RÉGIONS DU TISSU DE TRANSMISSION.....	41
14- DENSITÉ DES S <sub>11</sub> -RNASES VACUOLAIRES ET CYTOPLASMIQUES .....	42

## Remerciements

Je tiens à remercier particulièrement Louise Pelletier, non seulement pour ces fabuleuses coupes de 70 nm taillées au diamant, mais aussi pour sa disponibilité, sa bonne humeur et son franc-parler.

Je remercie aussi les étudiants du laboratoire Geitmann : Firas Bou Daher, Minako Kaneda et Youssef Chebli, pour avoir à maintes reprises partagé leur expertise dans le domaine de la microscopie.

Merci à Valentin Joly pour ses indications supplémentaires au niveau de la cinétique des tubes polliniques qui m'ont permis d'avancer dans mon projet.

Un merci général aux étudiants du laboratoire Morse pour leur soutien de tous les jours et d'avoir su être à l'écoute de mes préoccupations tant scientifiques que logistiques.

Un grand merci à Jonathan Soulard pour m'avoir initié aux différentes techniques de laboratoires et d'avoir partagé son expertise générale tout au long de mes études à la maîtrise.

Finalement des remerciements mérités aux professeurs Mario Cappadocia et David Morse qui m'ont accompagné dans mon aventure au 2<sup>e</sup> cycle. Ils ont su susciter mon intérêt et ma réflexion dans le domaine de la recherche scientifique. Ils ont permis l'aboutissement de mes travaux et la rédaction de ce mémoire. Encore une fois, merci!

# 1. Introduction

L'étude du phénomène de l'auto-incompatibilité des Solanacées amène plusieurs défis qui ont commencé à être élucidés depuis les dernières décennies. Plusieurs de ces défis seront discutés dans cette étude et pour bien saisir les idées qui y sont développées, il importe de connaître les concepts liés à l'incompatibilité gamétophytique basée sur les S-RNases et ceux liés à la morphologie des tubes polliniques. Ces deux domaines représentent les deux volets de cette introduction. Les notions d'incompatibilité forment le cœur de cette étude et seront essentielles à l'interprétation des résultats qui visent à apporter quelques nuances aux modèles proposés; elles seront donc traitées en premier. La morphologie des tubes polliniques et l'environnement stylaire dans lequel ils poussent seront essentiels quant à l'interprétation des résultats et des procédés utilisés pour leur obtention; elle sera traitée dans la deuxième partie.

## 1.1 À propos de l'incompatibilité gamétophytique de *S. chacoense*

### 1.1.1 Contexte et Définition

La reconnaissance cellulaire, c'est-à-dire l'identification d'une cellule par une autre, joue un rôle primordial chez les organismes vivants. Chez les plantes de tels phénomènes entrent en jeu, par exemple, à chaque fois qu'un grain de pollen se dépose sur un stigmate lors de la pollinisation. Les événements découlant de cette rencontre déterminent si le pollen est autorisé ou non à accomplir la fécondation, événement d'une importance primordiale pour la formation des fruits et des graines. La diversité génétique est un élément indispensable permettant à une population d'affronter les changements de son milieu. Le processus de sélection naturelle permet, quant à lui de sélectionner au cours des générations les individus ayant la constitution génétique la plus adaptée à son environnement. Or, pour assurer la fécondation par le pollen de la même espèce, et donc pour maintenir l'intégrité génétique de l'espèce, les Angiospermes utilisent plusieurs stratégies incluant l'hermaphrodisme, le contrôle strict du temps et de la durée de la floraison ainsi que l'association avec des pollinisateurs spécifiques.

D'autre part, certains angiospermes utilisent la ségrégation des sexes pour diminuer les risques d'auto-pollinisation; cette stratégie se nomme monoécie/diécie. Alors que les plantes monoïques possèdent des fleurs staminées et pistillées (non-hermaphrodite) à des endroits différents d'une même plante, les plantes dioïques possèdent seulement des fleurs d'un seul sexe.

Finalement, pour assurer la variabilité génétique au sein de l'espèce et dans le but d'éviter les effets néfastes de la dépression endogamique (inbreeding), les Angiospermes ont souvent recours à différents systèmes d'auto-incompatibilité (AI). L'AI représente donc un excellent modèle pour l'étude de la reconnaissance cellulaire. Il est néanmoins un phénomène d'une grande complexité, quant à la détection, la caractérisation et l'interaction des différentes molécules impliquées ainsi que l'élaboration des modèles de son fonctionnement.

L'auto-incompatibilité est la capacité génétiquement déterminée d'une plante de rejeter son propre pollen pour prévenir l'autofécondation (de Nettancourt 1997). Il s'agit donc d'une barrière prézygotique à la fertilisation. Il existe 2 types d'auto-incompatibilité : sporophytique et gamétophytique.

Le mécanisme sporophytique de l'auto-incompatibilité implique des protéines, les SCR/SP11 (Shiba *et al.* 2001) du tapetum (régions diploïdes de l'étamine où se forment les grains de pollen) et des récepteurs dimériques au niveau du stigma du style : SRK (Kachroo *et al.* 2001, Shimosato *et al.* 2007). Puisque le tapetum est formé de cellules diploïdes provenant de l'étamine, il laissera deux types de protéine SCR/SP11 d'haplotypes différents ou semblables à la surface du grain de pollen. Si l'une ou l'autre de ces protéines est reconnue par les deux récepteurs dimériques via une liaison allèle spécifique, le pollen sera rejeté (Shimosato *et al.* 2007).

*Solanum chacoense*, membre de la famille des Solanacées, est caractérisé par l'auto-incompatibilité dite de type gamétophytique, c'est-à-dire le phénotype compatible ou incompatible du pollen est déterminé par l'interaction entre son propre génotype et celui du pistil avec lequel ce pollen est entré en contact. Les détails moléculaires de ce dialogue entre pollen et pistil constituent l'objet de cette étude.

### **1.1.2 Les composantes stylaire et pollinique de l'incompatibilité chez *S. chacoense***

L'AI est un phénomène extrêmement complexe qui implique des composantes stylaire et pollinique appartenant à un locus multigénique et multiallélique nommé locus-S (de Nettancourt 1997, de Nettancourt 2001). Le résultat des interactions entre ces composantes, est que les plantes auto-incompatibles bloquent la croissance du pollen *self* tout en permettant au pollen non-*self* de croître dans le style et d'accomplir la fécondation. Ces composantes doivent répondre à 3 critères essentiels : être codées par le locus S, être exprimées au niveau de leurs tissus respectifs (style et pollen) et présenter du polymorphisme. On parle d'haplotypes pour désigner les différents locus-S et d'allèles pour désigner les variantes alléliques pour chaque gène présent au locus-S. L'absence de recombinaison à l'intérieur de ce locus (de Nettancourt 2001) suggère l'importance de la co-ségrégation de ces gènes lors de la méiose, condition indispensable pour conserver fonctionnel le mécanisme d'auto-incompatibilité.

#### **1.1.2.1 S-RNase**

La composante stylaire de l'AI fut la première à être découverte, il y a plus de 30 ans. L'analyse d'un gel bidimensionnel a permis de mettre en évidence une protéine polymorphique co-ségrégant avec les allèles S tels que déterminés par croisements (Bredemeyer et Blaas 1981). Cette protéine d'haplotype S<sub>2</sub> fut ensuite clonée à partir de sa séquence N-terminale (Anderson *et al.* 1986). Puis, des expériences de chromatographie et d'analyse de patrons de glycosylation permirent de distinguer différentes formes alléliques de cette protéine. (Clarke *et al.* 1989, Jahnen *et al.* 1989). Par homologie de séquence d'acides

aminés entre cette protéine polymorphique et la RNase d'*Aspergillus oryzae* et par observation de la dégradation d'ARN ribosomal par celle-ci, la fonction ribonucléase a pu être démontrée: pour cette raison la protéine fut renommée Ribonucléase du locus S ou S-RNase (McClure *et al.* 1989). Les S-RNases sont de glycoprotéines d'environ 30 kD produites par des cellules spécialisées du style et sécrétées dans la matrice extracellulaire (Gray *et al.* 1991). Des mutants gain-de-fonction et perte-de-fonction produits par transgénèse ont montré l'implication directe des S-RNases dans la reconnaissance du pollen et du rejet lors d'une réaction incompatible (Lee *et al.* 1994). Des études d'immunolocalisation faites dans notre laboratoire ont montré que les S-RNases entrent aussi bien dans les tubes polliniques compatibles que dans ceux incompatibles (Luu *et al.* 2000). L'internalisation des S-RNases par le tube pollinique n'est donc pas haplotype-spécifique. Par ailleurs, le mécanisme d'entrée n'est pas complètement élucidé et diverge selon les modèles (voir plus loin, section 1.1.3).

L'analyse des séquences de plusieurs S-RNases des Solanacées a révélé, entre autres, un patron caractéristique, de 5 régions courtes conservées (C1 à C5) dont les séquences en acides aminés ne diffèrent pas entre les différentes S-RNases (Ioerger *et al.* 1991). Les régions hydrophobes C2 et C3 forment le site actif contenant les acides aminés histidine associés à l'activité ribonucléase de la protéine (Ishimizu *et al.* 1995), activité essentielle à la réaction d'incompatibilité (Huang *et al.* 1994, Sims *et al.* 2010). Les régions hydrophobes C1, C5 et la région hydrophile C4, quant à elles, sont impliquées dans la stabilisation de la structure de la protéine (Kao et McCubbin 1996). La S-RNase contient aussi 2 régions hypervariables HVa et HVb. Ces régions présentent une variabilité parfois très forte au niveau de la séquence d'acides aminés entre S-RNases d'haplotypes différents (Ioerger *et al.* 1991). Cependant, certaines S-RNases ont des séquences fort similaires. Ainsi, les S<sub>11</sub>- et S<sub>13</sub>-RNases diffèrent par seulement 10 acides aminés, et des études de notre laboratoire ont montré qu'un changement de quatre acides aminés dans les régions HV permet de passer de S<sub>11</sub> à S<sub>13</sub> (Matton *et al.* 1997) alors que le changement de trois produit une S-RNase à double spécificité S<sub>11/13</sub> (Matton *et al.* 1999). Ceci a permis de définir les parties de la S-RNase qui constituent les déterminants de la spécificité allélique

### 1.1.2.2 Pollen-S

Le déterminant pollinique de l'AI ou Pollen-S, fut découvert il y a dix ans par séquençage du locus S chez *Antirrhinum* (Plantaginacée) à moins de 9 kb de la séquence de la S-RNase (Lai *et al.* 2002). Il s'agit d'un gène qui s'exprime exclusivement dans le pollen, et qui montre du polymorphisme, bien qu'inférieur à celui du gène de la S-RNase. Pollen-S, isolé depuis chez plusieurs Rosacées et chez *Petunia inflata* (Solanacée), est une protéine de type F-box, désignée S-locus F-box (SLF) ou S-F-Box haplotype-spécifique (SFB) chez les Rosacées. C'est chez *Petunia inflata* qu'on a obtenue la preuve que SLF représente la composante pollinique de l'AI. Chez les Solanacées, un phénomène curieux peut être observé chez les tétraploïdes non homozygotes: la compatibilité de leur pollen hétéroallélique (de Nettancourt 1977). Quand on pollinise une plante diploïde auto-incompatible  $S_1S_2$  avec un tétraploïde  $S_1S_1S_2S_2$ , on observe de la compatibilité. En effet, ce tétraploïde produira du pollen diploïde  $S_1S_1$ ,  $S_2S_2$  et  $S_1S_2$ , et c'est le pollen hétéroallélique  $S_1S_2$  qui est compatible sur tout pistil. Notre laboratoire a montré que dans le tube pollinique d'un grain de pollen diploïde hétérozygote, deux Pollen-S sont exprimés (Luu *et al.* 2001). Cette double expression mène à la compatibilité du croisement, peu importe les S-RNases présentes. Ce phénomène a été exploité pour confirmer chez *Petunia inflata* l'identité des SLF comme étant des véritables Pollen-S, car, en exprimant un SLF d'haplotype  $S_1$  dans du pollen d'haplotype  $S_2$ , ce pollen transgénique se révéla compatible sur un pistil d'haplotype  $S_1S_2$ , qui normalement devait le rejeter. Ce pollen ayant deux SLF différents était devenu compatible tout comme du pollen hétéroallélique (Sijacic *et al.* 2004).

Cependant, les analyses des SLFs chez différentes espèces allaient réserver bien des surprises. La première fut la découverte que le locus-S code pour plusieurs SLF (Hua *et al.* 2007). De plus, toujours chez *Petunia inflata*, on a vu que le pollen hétéroallélique n'est pas toujours compatible, et que des SLF ayant la même séquence peuvent être reconnues par des S-RNases d'haplotype différent (Kubo *et al.* 2010). Ces constats et des expériences de transgénèse ont permis de donner un nouveau visage à la composante pollinique de l'incompatibilité. Celle-ci serait en effet formée d'un ensemble de SLFs qui se trouvent sur le même locus-S, ayant chacune une spécificité variable pour les différentes S-RNases (Kubo *et*

*al.* 2010). Donc pour un haplotype donné, c'est l'ensemble des SLFs qui permet de reconnaître toutes les S-RNases sauf celles qui partagent le même haplotype. Cette multi-génicité de la composante pollinique a été interprétée comme ayant une signification évolutive rendant le système d'AI moins susceptible aux mutations qui pourraient compromettre son intégrité, puisque plusieurs SLFs peuvent éventuellement lier la même S-RNase.

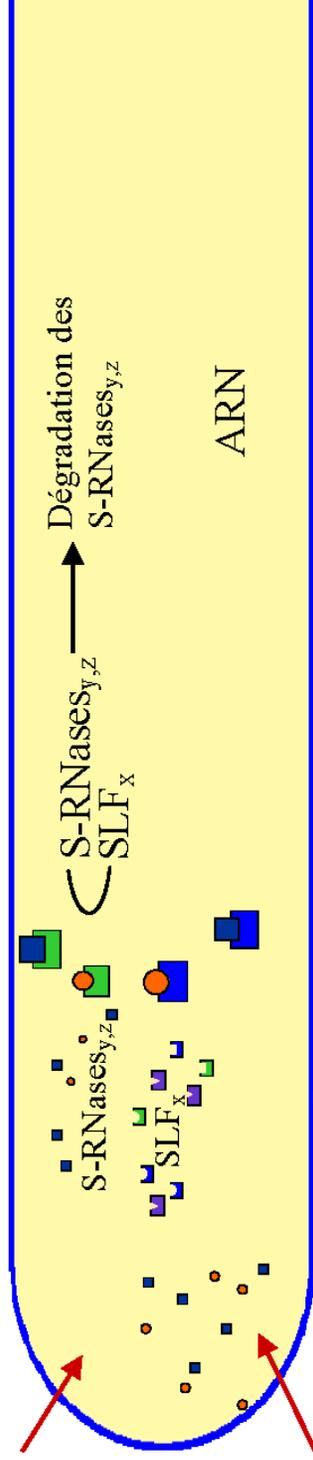
### **1.1.3 Modèles pour l'auto-incompatibilité basée sur la S-RNase**

Différents modèles ont été avancés pour expliquer comment les tubes polliniques compatibles échappent à l'effet cytotoxique de la S-RNase. Un de ces modèles propose que la reconnaissance de la S-RNase d'un haplotype donné par la SLF d'un autre haplotype mène à l'ubiquitination de cette S-RNase, qui serait ensuite envoyée vers le protéasome 26S pour y être dégradée (Hua et Kao 2008). C'est le modèle dit de la dégradation. Un autre modèle propose plutôt la séquestration initiale de toutes les S-RNases dans les vacuoles des tubes polliniques. Par la suite, dans les tubes incompatibles, la membrane des vacuoles serait déstabilisée, permettant le déversement des S-RNases dans le cytoplasme, où elles exerceraient leur effet cytotoxique. Dans les tubes compatibles, par contre, les S-RNases resteraient dans la vacuole, permettant ainsi au tube pollinique de poursuivre son chemin vers l'ovaire. C'est le modèle de la séquestration (Goldraij *et al.* 2006).

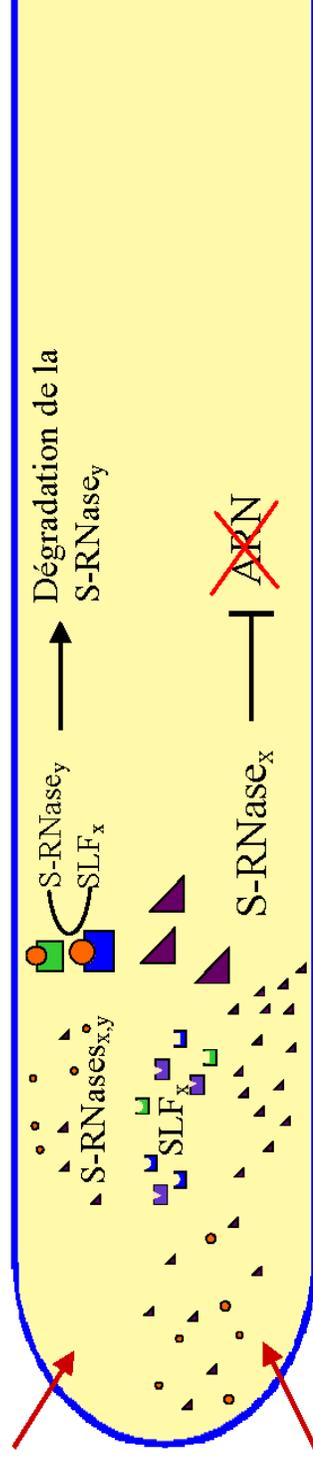
#### **1.1.3.1 Modèle de la dégradation**

Ce modèle, proposé pour expliquer les croisements compatibles, a été fortement consolidé par l'identification de Pollen-S comme étant une F-box (Lai *et al.* 2002). En effet, l'hypothèse de la dégradation de la S-RNase lors de croisements compatibles est supportée par la présence du domaine F-box des SLF, domaine impliqué dans un complexe d'ubiquitine ligase (E3), et plus spécifiquement le complexe SFC (Skip1-Cullin-F-Box). Ce modèle est renforcé par l'observation faite grâce à des expériences *in vitro* que la S-RNase établit une liaison faible avec la SLF correspondant à son locus S et une liaison forte avec toute autre SLF (Hua et Kao 2006).

Compatible



Incompatible



Légende

SLFx:  S-RNase<sub>y</sub>:  S-RNase<sub>x</sub>:  S-RNase<sub>z</sub>: 

Figure 1 : Modèle de la dégradation des S-RNases tel que formulé par Hua et al. 2008. Flèche rouge : transport vers le cytoplasme.

Le processus d'ubiquitination d'une protéine commence par un complexe d'activation E1 qui lie une ubiquitine, puis la transfère au complexe E2 qui à son tour la transfère au substrat lié au complexe E3 (Hershko et Ciechanover 1998, Moon *et al.* 2004, Smalle et Vierstra 2004). Le complexe E3 n'est formé de protéines ni polymorphique ni codées par le locus-S, il n'est donc pas lié au système de reconnaissances de l'auto-incompatibilité. Dans ce complexe, Skip1 lie la protéine F-box, le substrat et Cullin. La protéine Cullin lie Skip1 et une autre protéine, RBX1, qui lie le complexe de conjugaison d'ubiquitine E2. Cependant ni la protéine Skip1 ni la RBX1 ne semblent lier la F-Box ou la S-RNase (Hua et Kao 2006). Par contre, une protéine nommée SBP (S-RNase-binding-protein) est capable de lier non seulement la S-RNase et le domaine F-box, mais aussi la protéine Cullin et le complexe E2 (O'Brien *et al.* 2004). Il a donc été suggéré que SBP pourrait remplacer Skip1 et RBX1 dans un complexe E3 atypique (Hua et Kao 2006). L'ubiquitination de la S-RNase conduirait à sa dégradation par le protéasome 26S dans les tubes polliniques compatibles. Différentes observations supportent cette hypothèse. En inhibant le protéasome, la croissance des tubes polliniques compatibles est inhibée (Qiao *et al.* 2004a). Des expériences *in vitro* ont démontré l'ubiquitination et la dégradation des S-RNases par le protéasome (Hua et Kao 2006). Une diminution *in vivo* de 30 % de S-RNases chez les styles de *S. chacoense* a pu être mesurée lors des croisements compatibles, mais pas lors de croisements incompatibles (Liu *et al.* 2009).

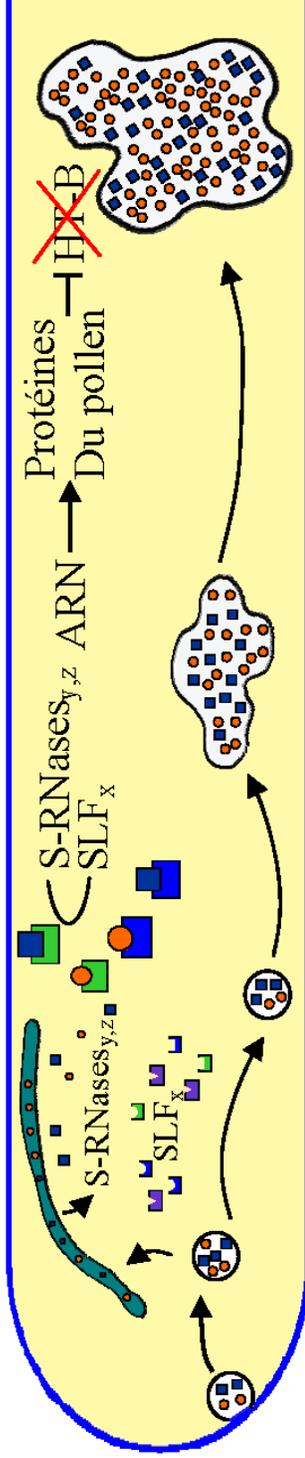
Ce modèle prend en compte l'affinité faible et forte qu'ont les SLF envers les S-RNases (Hua *et al.* 2008). Lors d'un croisement incompatible, l'interaction faible  $S_1$ -SLF<sub>1</sub> ne suffit pas à neutraliser l'activité de la S-RNase et en absence d'interaction forte, la réaction d'incompatibilité a lieu comme prévu (Figure 1). Ce modèle explique aussi la compatibilité du pollen hétéroallélique des plantes tétraploïdes. En effet, lors de la pollinisation d'un style avec un pollen transgénique hétéroallélique (contenant 2 SLF d'haploïde différent), on observe toujours une réaction de compatibilité, tout comme lors d'un croisement entre un diploïde et son tétraploïde ( $S_1S_2 \times S_1S_1S_2S_2$ ). Le modèle de la dégradation peut expliquer ce phénomène puisque les interactions faibles  $S_1$ -SLF<sub>1</sub> et  $S_2$ -SLF<sub>2</sub> seront en compétition avec les interactions fortes  $S_1$ -SLF<sub>2</sub> et  $S_2$ -SLF<sub>1</sub>. La balance ira en faveur de ces dernières et cela mènera à un croisement compatible, ce qui est corroboré par les observations. Malgré les avantages de ce

modèle, il ne tient pas compte de la protéine HT-B (vois ci-après) impliquée dans le phénomène de l'incompatibilité et de la séquestration des S-RNases dans les vacuoles observée par microscopie (Goldraij *et al.* 2006).

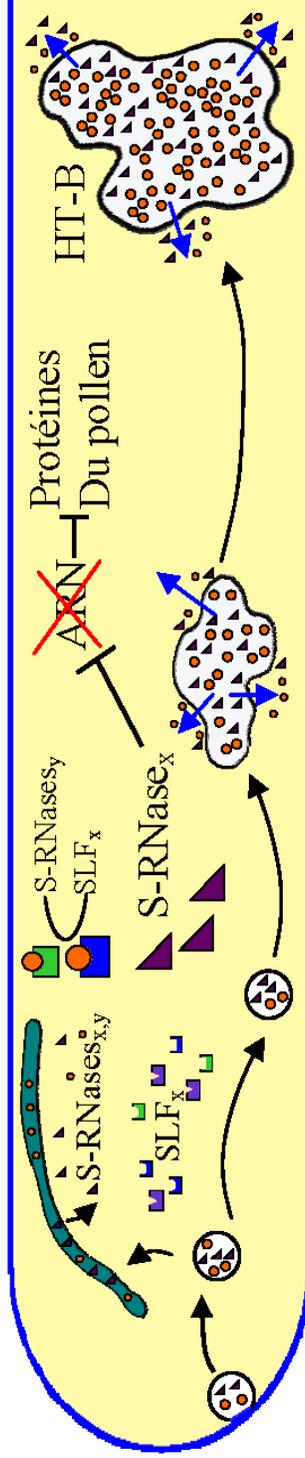
### **1.1.3.2 Modèle de la séquestration**

Ce modèle a été suggéré après l'observation par microscopie confocale de la présence des S-RNases dans un compartiment vacuolaire où elles semblent être initialement séquestrées (Goldraij *et al.* 2006). Selon ce modèle, les S-RNases du style entrent dans les tubes polliniques de manière S-haplo type indépendante (Luu *et al.* 2000) par endocytose. Par la suite, elles sont dirigées vers une vacuole où elles vont rester confinées si le tube pollinique est de type non-self (donc si le croisement est compatible). Cependant, et d'une manière encore mal caractérisée, une petite quantité de ces S-RNases échapperait à la séquestration vacuolaire pour entrer en interaction avec les SLF qui sont présentes dans le cytoplasme (Hua *et al.* 2007, Meng *et al.* 2011). Il se formerait alors un complexe où ces S-RNases seraient inactivées. Les S-RNases ne pouvant pas utiliser leur activité ribonucléase, essentielle à l'incompatibilité (Huang *et al.* 1994), le tube pollinique peut croître sans encombre. Cependant, selon ce modèle, l'effet principal de ce complexe serait de permettre la dégradation (ou l'inactivation) d'une autre protéine, HT-B, qui serait au cœur du modèle de la séquestration. Cette petite protéine (8,7 kDa) (O'Brien *et al.* 2002) produite elle aussi par les cellules du tissu de transmission du style, entrerait dans les tubes polliniques de la même manière que les S-RNases. Sa fonction serait de déstabiliser les membranes de la vacuole libérant ainsi les S-RNases qui s'y trouvent séquestrées. Celles-ci peuvent alors dégrader l'ARN ribosomal, déclenchant ainsi la réaction d'auto-incompatibilité qui aboutirait à l'arrêt de croissance du tube pollinique (McClure 2006). Par contre, ça serait la dégradation de HT-B qui aurait comme résultat la compatibilité (Figure 2). Parmi les preuves supportant ce modèle, on note que la quantité de HT-B marquée par immunofluorescence est moindre dans les tubes compatibles que dans les tubes incompatibles (Goldraij *et al.* 2006). De plus, l'inhibition de HT-B par des ARN anti-sens restaure partiellement la compatibilité dans des croisements de type incompatible (O'Brien *et al.* 2002). Un autre appui à ce modèle viendrait des expériences

## Compatible



## Incompatible



## Légende

$SLF_x$ :   $S\text{-RNase}_y$ :   $S\text{-RNase}_x$ :   $S\text{-RNase}_z$ : 

Figure 2 : Modèle de la séquestration des S-RNases tel que formulé par Goldraij et al. 2006. Flèche bleue : transport vers le cytoplasme suite à l'action de HT-B.

de Meng en 2009 (Meng *et al.* 2009), qui ont exprimé une S-RNase:GFP dans le pollen (sous le contrôle du promoteur d'expression pollinique LAT-52). Dans ces expériences *in vitro*, la présence de la S-RNase ne bloque pas la croissance du tube pollinique étant donné l'absence de HT-B qui est une protéine stylaire. Il est donc suggéré dans ce modèle que HT-B joue le rôle déterminant dans l'incompatibilité.

Une difficulté avec ce modèle est que le mécanisme permettant à la S-RNase d'être séquestrée dans des vacuoles l'empêche d'interagir avec les SLF cytoplasmiques. McClure a proposé que la S-RNase parcourt un trajet similaire à celui d'un autre produit toxique, la ricine, lorsque celle-ci est introduite dans une cellule de mammifère. La ricine est endocytée puis, alors que la majorité des molécules seront acheminées vers les vacuoles, certaines iraient au golgi pour ensuite être conduites au réticulum endoplasmique. La protéine peut ensuite être transportée dans le cytoplasme où elle serait dégradée par un processus nommé ERAD - Dégradation Associée au Réticulum Endoplasmique - (McClure 2006). Tout ceci n'a pas été démontré chez la S-RNase, donc ce n'est qu'une hypothèse qu'il reste à prouver. Il est à noter que le modèle de la dégradation protéique (Hua et Kao 2008), dépasse certaines faiblesses du modèle de séquestration. Dans ce modèle, les S-RNases se retrouvent dans le cytoplasme du tube pollinique, où elles ont la possibilité d'interagir avec la SLF pour former un complexe. Le modèle est toutefois vague sur la manière dont les S-RNases entrent dans le cytoplasme.

### **1.1.3.2 Modèle proposé**

Il n'est pas impossible de combiner les deux modèles décrits ci-dessus. Dans le modèle synthèse que nous proposons, les S-RNases entreraient dans le tube pollinique par endocytose et seraient transportées par le système vésiculaire du tube pollinique vers des compartiments vacuolaires de plus grande taille (Goldraij *et al.* 2006). Puis, par un mécanisme inconnu, de quantités non négligeables des S-RNases fuiraient constamment vers le cytoplasme, remplacées par des S-RNases nouvellement endocytées. Les S-RNases désormais cytoplasmiques seraient prises en charge par les SLFs qui, selon leur haplotype, causeraient leur dégradation ou laisseraient intacte leur l'activité ribonucléase. Dans le cas de la compatibilité, le tube pollinique posséderait à la fois une quantité de S-RNases vacuolaires

(McClure 2006) et des S-RNases dégradées (Hua et Kao 2006, Liu *et al.* 2009). Dans ce cas l'ARN ribosomal du tube resterait intact et permettrait la synthèse des protéines notamment celles qui provoqueraient la dégradation de HT-B. Ceci maintiendrait intacte la membrane vacuolaire renfermant les S-RNases. Dans le cas d'un tube pollinique incompatible, la dégradation des S-RNases n'ayant pas lieu, celles-ci s'accumuleraient dans le cytoplasme en dégradant les ARN ribosomiaux (Huang *et al.* 1994). Après un certain temps, la protéine responsable de la dégradation d'HT-B ne serait plus synthétisée et HT-B s'accumulerait près de la membrane vacuolaire et provoquerait la déstabilisation de celle-ci, conduisant à la libération des S-RNases qui s'y trouvent (Figure 3).

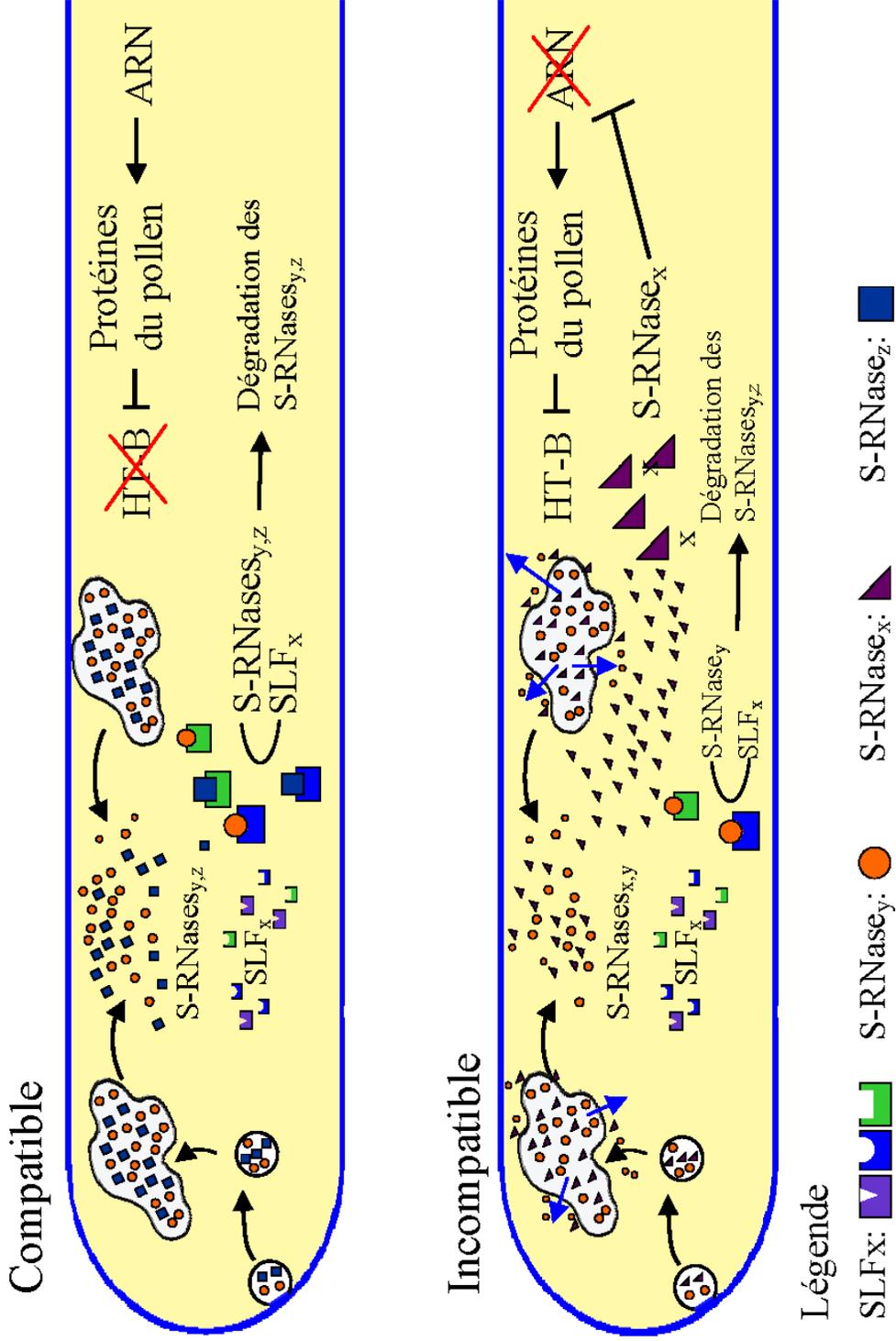


Figure 3 : **Modèle proposé par cette étude.** Flèche bleue : transport vers le cytoplasme suite à l'action de HT-B.

## 1.2 Morphologie du style et des tubes polliniques chez *S. chacoense*

### 1.2.1 Morphologie du style

Chez les Solanacées, le pistil présente un style compact. Les tubes polliniques progressent dans les espaces intercellulaires du stigmate et du tissu de transmission jusqu'aux micropyles des ovules. Comme son nom l'indique, c'est le tissu de transmission qui sert de lien entre le stigmate et l'ovaire. Une coupe transversale du style de *S. chacoense* observée par microscopie électronique révèle trois tissus différents: le tissu de transmission, le tissu cortical et le tissu épidermique. Le tissu de transmission occupe la partie centrale du style et est composé de cellules sécrétrices. Il s'agit d'un tissu dont les cellules sont cohérentes entre elles seulement par leurs parois transversales où persistent les plasmodesmes. Les espaces intercellulaires sont larges et présentent une matrice opaque à la microscopie électronique, riche en phosphatases, acides, peroxydases et carbohydrates (Herrero et Dickinson 1979). Plus important encore, c'est dans la matrice extracellulaire que sont excrétées les S-RNases. Les cellules du tissu de transmission déversent aussi d'autres protéines vers la matrice extracellulaire. Parmi celles-ci, une protéine de 120 kD dont la fonction est encore inconnue, et la protéine HT-B au centre du modèle de séquestration (McClure *et al.* 2011). Entourant le tissu de transmission, il y a le tissu cortical, composé de grandes cellules possédant peu de cytoplasme tout au tour d'une très large vacuole qui occupe la presque totalité de la cellule. Le tissu épidermique, qui possède une seule assise de cellules, encercle la partie périphérique du style et est recouvert d'une cuticule et d'une couche de cire épicuticulaire (Safavian et Shore 2010).

La présence d'importantes concentrations de S-RNases dans l'ensemble du tissu de transmission rend difficile les analyses de type « Western » visant à quantifier leur absorption par les tubes polliniques. Par contre, les techniques d'immunohistochimie sont tout à fait appropriées pour mesurer cette quantité à l'intérieur des tubes polliniques compatibles et incompatibles à différents temps après pollinisation. Cette technique demeure toutefois difficile à calibrer afin d'avoir un marquage égal à travers les différents traitements. De plus cette technique demeure semi-quantitative dans le sens où il est impossible de déduire la

concentration réelle de S-RNase à partir de l'immunomarquage. Il est toutefois possible de comparer les quantités relatives de S-RNase entre les différentes régions du style.

### 1.2.2 Morphologie du tube pollinique

Chez les Angiospermes, le rapprochement des gamètes débute avec la libération du pollen par l'ouverture des étamines et se termine par la libération des gamètes dans le sac embryonnaire. On distingue plusieurs étapes: la pollinisation, l'adhésion du pollen sur le stigmate, la réhydratation du pollen, la germination produisant le tube pollinique et la décharge des gamètes haploïdes dans le sac embryonnaire suivie par la double fécondation. Chez *S. chacoense*, le pollen mur est bicellulaire, c'est-à-dire formé par la cellule végétative et celle génératrice. C'est seulement après la germination que la deuxième mitose a lieu dans la cellule génératrice, ce qui portera à la formation des gamètes. Le pollen compatible ou incompatible germe indistinctement sur le stigma, et ce n'est que dans le style qui s'effectuera la discrimination entre les tubes compatibles et incompatibles.

Le tube pollinique présente un type de croissance particulière. Pour transporter les noyaux jusqu'à l'ovaire, il doit croître dans le tissu de transmission sur une distance d'environ un centimètre dans le cas de *S. chacoense*. Cette croissance, localisée à l'apex du tube est obtenue par une poussée du cytoplasme sur le dôme apical, ce qui entraîne l'élongation du tube. Cette poussée est fournie par la turgescence du tube pollinique. Afin de séquestrer son cytoplasme actif (contenant les organites) à son apex, le tube pollinique formera une série de septums. Grâce à ces cloisonnements successifs constitués de bouchons de callose, le volume cytoplasmique est fractionné. En d'autres mots, quand le volume du cytoplasme actif devient trop grand, un bouchon de callose se forme dans la partie distale du tube. Ce processus se répète à intervalles réguliers.

Dans l'apex du tube pollinique, on distingue 4 zones distinctes : apicale, subapicale, nucléaire et vacuolaire (Cresti *et al.* 1977). La zone apicale est celle de la croissance du tube pollinique. Elle est caractérisée par la présence de nombreuses vésicules de transport, par l'absence d'organites et une forte concentration de ions  $Ca^{2+}$  (Cai *et al.* 2000). L'endocytose est plus fréquente à la pointe de cette région et l'exocytose plus fréquente dans la région

entourant la pointe (Chebli *et al.* 2013). La zone subapicale est caractérisée par la présence des organites et d'un réseau de filaments d'actine très développé, le cytoplasme paraît plus opaque en microscopie électronique en transmission (Herrero et Dickinson 1981). Les événements d'endocytose sont particulièrement fréquents dans cette zone (Chebli *et al.* 2013). La zone nucléaire, comme son nom l'indique, contient la cellule générative et le noyau végétatif. Finalement, la zone vacuolaire est l'endroit où se forme une large vacuole comblant l'espace entre le cytoplasme et le dernier bouchon de callose. C'est donc dans cette zone que se formera le septum suivant (Steer et Steer 1989) (Figure 4a).

Le tube pollinique se présente donc comme une suite de compartiments séparés par des bouchons de callose. Le dernier compartiment diffère des autres par la présence de cytoplasme actif, alors que les autres compartiments contiennent seulement du cytoplasme résiduel. Ceci peut être facilement observé par microscopie à fluorescence en utilisant une simple coloration au Bleu d'Aniline qui marque tout autant les bouchons de callose ainsi que la paroi interne des tubes polliniques (Matton *et al.* 1997) (Figure 5 et 6).

Contrairement à celle des autres cellules végétales, la paroi cellulaire des tubes polliniques ne contient que peu de cellulose. D'autres substances, telles la callose et la pectine composent la paroi du tube pollinique (Schlupmann *et al.* 1994). Vu son rôle spécialisé, il n'est pas surprenant que le tube pollinique possède une paroi spécifique dont le rôle est plus qu'un simple soutien mécanique. Cette paroi n'est pas uniforme sur toute la longueur du tube. Effectivement elle est plus épaisse et solide en position distale et plus mince vers l'apex (Geitmann et Steer 2006). Puisque le cytoplasme se trouve en région apicale, c'est dans cette région que les échanges avec la matrice extracellulaire seront le plus actifs. La porosité, le pH et les ions de la paroi peuvent donc avoir un possible rôle sélectif filtrant les constituants de la matrice extracellulaire qui entrent en contact avec la membrane plasmique du tube (de Graaf *et al.* 2004).

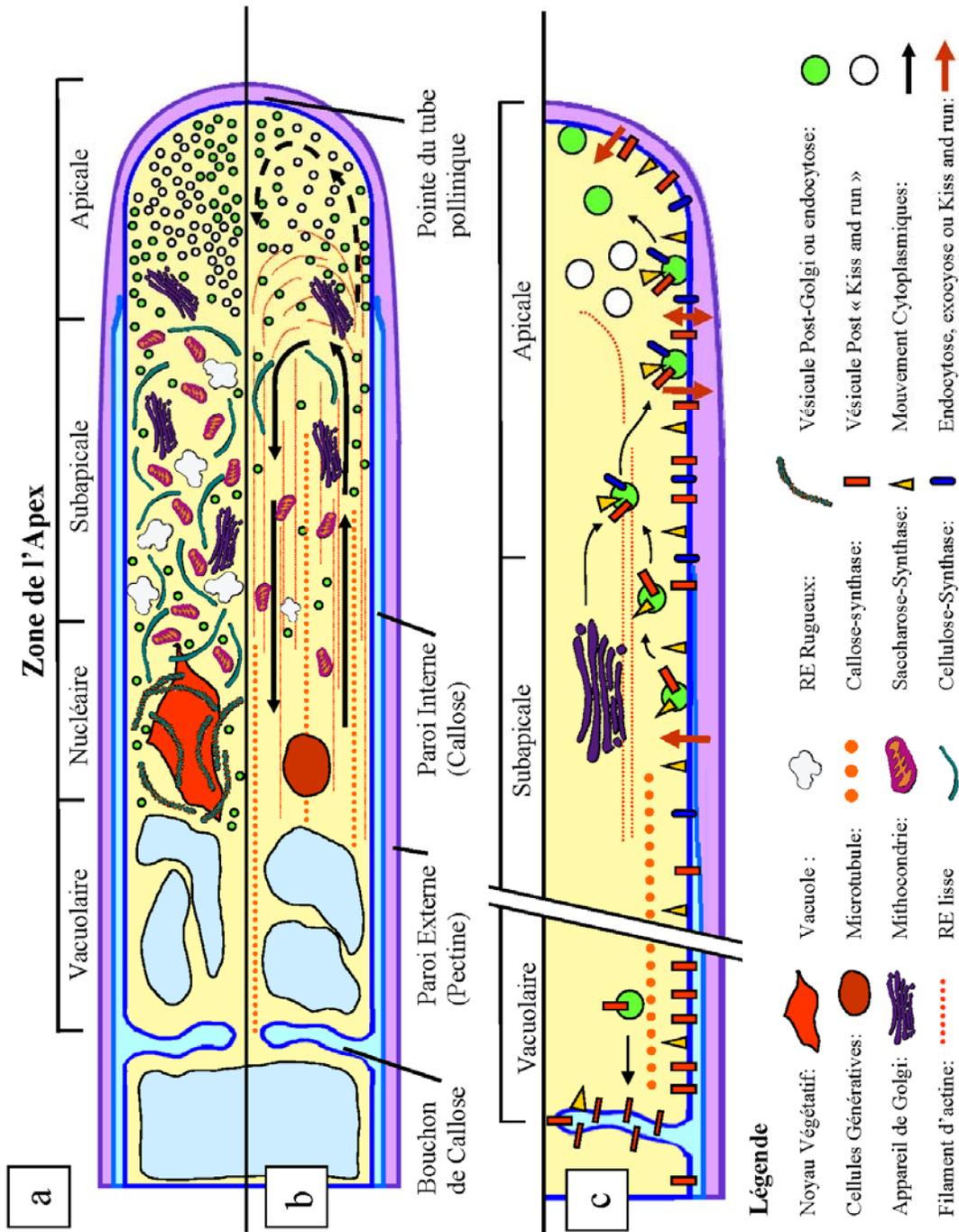


Figure 4 : **Représentation schématique d'un tube pollinique.** a) Description des 4 zones de l'apex et leurs constituants cellulaires. b) Mouvement cytoplasmique et réseau de filaments d'actine et de microtubules. c) Répartition des enzymes nécessaires à la synthèse de la paroi de callose et transport vésiculaire.

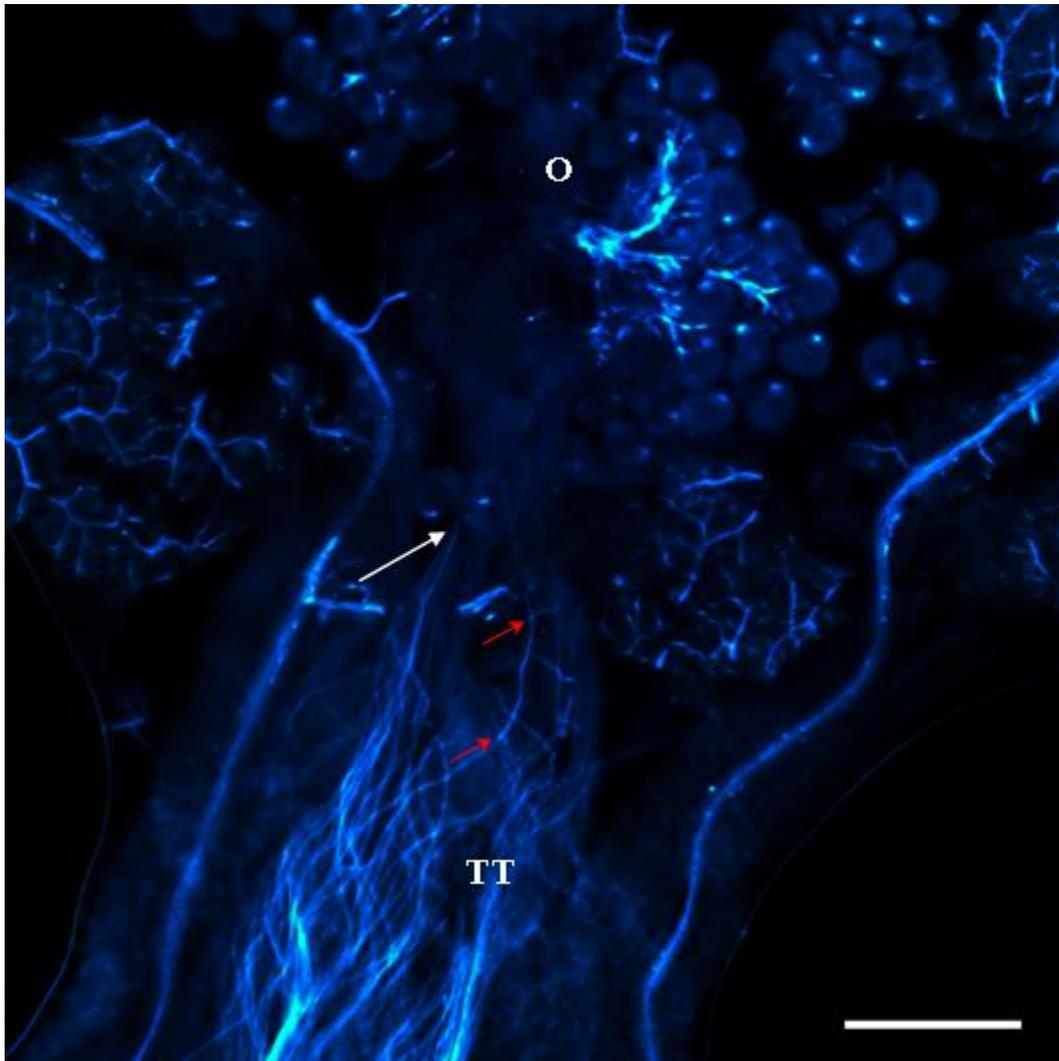


Figure 5 : Photographie d'un style de *Solanum chacoense*, envahit par des tubes polliniques compatibles, observés par microscopie à fluorescence. Le style est coloré au bleu d'aniline afin de marquer la paroi de callose des tubes polliniques 24h post-pollinisation. TT : Tissu de transmission; O : Ovaire; flèche blanche : le tube pollinique le plus long, flèche rouge : bouchon de callose. Échelle : 500  $\mu\text{m}$

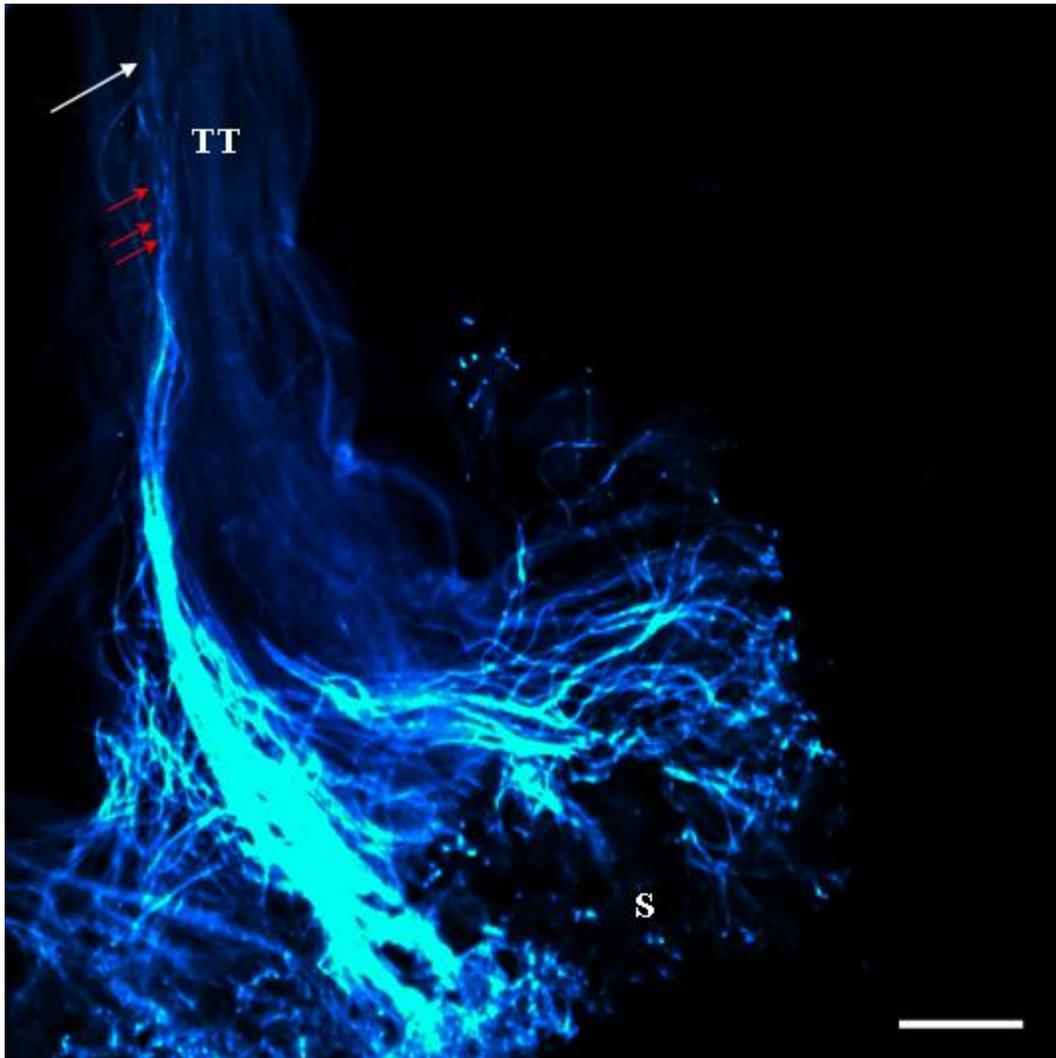


Figure 6 : Photographie d'un style de *Solanum chacoense*, envahit par des tubes polliniques incompatibles, observé par microscopie à fluorescence. Le style est coloré au bleu d'aniline afin de marquer la paroi de callose des tubes polliniques 24h post-pollinisation. TT : Tissu de transmission; O : Ovaire; flèche blanche : le tube pollinique le plus long, flèche rouge : bouchon de callose . Échelle : 500  $\mu$ m

Du point de vue chimique, la paroi du tube est formée principalement de pectine ester-méthylrique. Cette substance est excrétée par exocytose à l'apex du tube pollinique (Li *et al.* 2002). La paroi se révèle mince et poreuse à la microscopie électronique. Cependant, près de la pointe de l'apex, le tube excrète une enzyme, la pectine méthyl-estérase, qui libère le groupement méthyle de la pectine qui sera alors disponible pour créer des ponts  $Ca^{2+}$ . La genèse de ces ponts entraîne la gélification de la pectine qui forme alors un réseau solide. Ce réseau forme la paroi externe du tube pollinique qui le recouvre en entier, à l'exclusion de la pointe de son apex (Geitmann et Steer 2006).

Dans la zone subapicale, une seconde couche, la paroi interne, se forme à l'intérieur de la paroi externe. Celle-ci sera majoritairement formée de callose (Geitmann *et al.* 1995), mais également de cellulose. La paroi interne n'est pas synthétisée selon le même mécanisme que celle de pectine. La cellulose sera ajoutée à la paroi interne via la cellulose-synthase et la callose par une protéine nommée callose-synthase, toutes deux étant des protéines transmembranaires (Cai *et al.* 2011). Ces enzymes utilisent comme substrat l'UDP-glucose lui-même issu de la dégradation du saccharose (SUC) par la saccharose-synthase (SUS) ou synthétiser par l'UDP-glucose phosphorylase à partir du glucose-1-phosphate et de l'UTP (Amor *et al.* 1995). Contrairement aux fibres de cellulose qui ont une orientation commune nécessitant que les molécules de cellulose-synthase soient rassemblées en cercle (rosette), les fibres de callose sont déposées sans orientation particulière, ce qui permet à la callose-synthase d'être distribuée aléatoirement dans la membrane plasmique des tubes polliniques (Desh et Hong 2001).

La callose-synthase associée à la membrane plasmique semble être transportée sur le lieu de synthèse par transport vésiculaire utilisant le réseau de microtubules du tube pollinique (Cai *et al.* 2011). Contrairement à la paroi externe, qui est formée qu'à partir de la pointe de l'apex du tube, la paroi interne se forme tout au long de la cellule. La distribution de la callose-synthase est complexe et encore méconnue. (Figure 4c) En effet, il est possible d'observer une grande quantité de callose-synthase dans la zone apicale, alors qu'aucune déposition de callose n'est observée dans cette région (Chebli *et al.* 2012). Une hypothèse serait qu'elle serait présente, mais inactive au niveau apical, pour qu'elle puisse ensuite se

retrouver en position subapicale là où la déposition de callose est amorcée (Brownfield *et al.* 2008). Le transport de la callose-synthase au niveau de la zone subapicale est très faible vu l'infime quantité de protéine qui se retrouve dans la membrane plasmique dans cette région. Ailleurs, la callose-synthase est présente de manière plutôt uniforme sauf dans la région où se formera un bouchon de callose où elle est plus abondante (Cai *et al.* 2011). Avec un marquage contre la callose, il est possible de distinguer chez les tubes polliniques en coupe transversale, une paroi interne et externe (Figure 5 et 6). Le principal rôle de la paroi interne est d'offrir une meilleure résistance contre les forces de tension et de compression (Chebli *et al.* 2012). En microscopie électronique la paroi est peu opaque aux électrons et paraît donc claire sur micrographe (Herrero et Dickinson 1979).

Tel que mentionné auparavant, le tube pollinique formera des bouchons de callose à intervalles réguliers (Franklin-Tong 1999). La membrane plasmique s'invaginera pour créer un septum qui isolera l'apex du reste du tube pollinique (Cortal *et al.* 2008). La quantité plus importante de callose-synthase dans les bouchons de callose en formation suggère qu'un supplément de cette protéine soit transporté dans cette région via un transport vésiculaire, utilisant le réseau de microtubules cortical du tube. Cette hypothèse est appuyée par le fait qu'une dépolymérisation des microtubules par l'oryzaline provoque une réduction du nombre de bouchons de callose dans le tube pollinique (Cai *et al.* 2011).

La croissance apicale du tube pollinique dépend de la nouvelle membrane, formée par le transport vésiculaire. Celui-ci est dépendant d'un important réseau d'actine cortical qui se replie à l'apex vers l'intérieur. Ce réseau transportant les vésicules donne l'impression d'une fontaine inversée, ou cône (Chebli *et al.* 2013) (Figure 4b), et la présence des vésicules donne un aspect clair au cytoplasme de la zone apicale sur des micrographes. Les vésicules se présentent sous la forme d'un cône à la pointe du tube pollinique (Chebli *et al.* 2013). Ce transport vésiculaire augmente non seulement la surface de la membrane plasmique, mais contribue aussi à la formation de la paroi cellulaire ainsi qu'à l'exocytose de protéines digestives pour dégrader les constituants de la matrice extracellulaire du pistil (Chebli *et al.* 2013). Cependant, une si grande quantité de matériel est relâchée dans la matrice extracellulaire qu'il est impossible que toutes les vésicules de transport puissent contribuer à

l'extension de la membrane (Chebli *et al.* 2013). À titre d'exemple, il a été possible de calculer que seulement 13,1 % des vésicules participent à l'extension de la membrane plasmique des tubes polliniques chez le tabac (Derksen *et al.* 1995). Une hypothèse suggère que le matériel membranaire soit réinternalisé par un mécanisme d'entocytose utilisant un mécanisme dépendant de la clathrine. Or ce mécanisme suppose la création de puits recouverts de clathrine; c'est le lieu de l'endocytose. Cependant, l'observation du nombre de ces régions au niveau de l'apex du tube pollinique ne permet pas d'estimer assez d'évènements d'endocytoses pour expliquer l'extension limitée de la membrane plasmique. (Derksen *et al.* 1995) Or, une autre hypothèse suggère que le matériel nécessaire à la création de la paroi cellulaire soit relâché par un mécanisme de type *kiss and run* (Bove *et al.* 2008). Ce mécanisme présente une exocytose partielle suivie immédiatement d'une endocytose, le matériel est donc livré sans extension de la membrane plasmique.

En plus des vésicules, le tube doit transporter vers l'ovaire les noyaux et l'ensemble des organites. Si le transport du noyau et des cellules génératives semble être relié au réseau de microtubules via des moteurs protéiques tels que la dynéine et kinésine (Moscatelli *et al.* 1998), les organites sont plutôt déplacés sur le réseau très dense d'actine de la zone subapicale. Le moteur protéique utilisé est alors la myosine (Chebli *et al.* 2013). Ce réseau d'actine présente lui aussi un aspect de fontaine inversée. Le cytoplasme subit un mouvement de cyclose qui permet le transport des constituants cytoplasmiques (Chebli *et al.* 2013) (Figure 4b).

La croissance du tube pollinique au niveau de la zone apicale est donc un processus fort complexe faisant intervenir la pression de turgescence, l'osmorégulation et un assemblage d'endocytose et d'exocytose. De plus, la sécrétion apicale de pectine méthyl-estérase suggère que pour canaliser la croissance du tube dans la bonne direction, certaines régions de la paroi seront gélifiées, devenant ainsi plus rigides (Chebli *et al.* 2013). La croissance du tube pollinique se fait par à-coups; cette oscillation de la croissance provoque des zones où la paroi de pectine est plus dense sous la forme d'anneaux distribués régulièrement tout au long du tube pollinique (Geitmann et Steer 2006).

### **1.2.3 Différence de morphologie entre tubes polliniques compatibles et incompatibles**

Comparés aux tubes compatibles, les tubes polliniques incompatibles présentent certaines différences au niveau morphologique. La plus évidente est bien sûr leur longueur réduite, due au ralentissement de leur croissance et son arrêt (Herrero et Dickinson 1981) (Figure 5 et 6). La paroi est particulièrement plus mince à l'apex et le cytoplasme est plus compact. Dans ces mêmes tubes, la distribution de la callose est très irrégulière (Figure 6). Les observations microscopiques révèlent que certains tubes ne présentent aucune paroi interne, d'autres possèdent une paroi interne dont l'épaisseur est variable. Enfin, certains tubes montrent des dépôts importants de callose au niveau des septums riches en callose qui sont distribués de manière anormale tout au long du style (Geitmann et Steer 2006).

### 1.3 À propos de cette étude

Cette étude vise à déterminer l'emplacement de la S-RNase dans le tube pollinique en fonction du temps post-pollinisation et des conditions de compatibilité ou d'incompatibilité. Les techniques d'immunohistochimie permettent de visualiser la quantité de S-RNase cytoplasmique et vacuolaire. Nous tenterons de fournir des indices quant au mode d'entrée des S-RNases dans les tubes polliniques, à leur localisation dans celui-ci, à leur possible dégradation et à leur éventuelle accumulation. Il sera alors possible de discuter certaines hypothèses proposées par les différents modèles.

<i>Modèle</i>	<b>Compatible</b>		<b>Incompatible</b>	
	<i>Vacuole</i>	<i>Cytoplasme</i>	<i>Vacuole</i>	<i>Cytoplasme</i>
<b>Dégradation</b>	Non	Oui (peu)	Non	Oui
<b>Séquestration</b>	Oui	Non (peu)	Non	Oui
<b>Synthèse</b>	Oui	Oui (peu)	Oui	Oui

Tableau 1 : Tableau prévoyant la présence de S-RNases dans les compartiments du tube pollinique selon le type de croisement et le modèle considéré.

## **2. Matériels et méthodes**

### **2.1 Description du matériel biologique**

Pour les différentes expériences nous avons utilisé des fleurs fraîchement ouvertes issues de plantes de *Solanum chacoense* d'haplotype approprié. Les styles utilisés pour les croisements proviennent d'une plante nommée V22, d'haplotype (S<sub>11</sub>S<sub>13</sub>) (Qin *et al.* 2001). Le pollen utilisé provient des plantes transgéniques nommées tGFP 2548 d'haplotype (S<sub>12</sub>S<sub>12</sub>) et tGFP 1022 d'haplotype (S<sub>11</sub>S<sub>13</sub>) exprimant toutes deux la GFP (Liu *et al.* 2009).

### **2.2 Préparation des échantillons**

Deux types de croisements ont été effectués sur les fleurs de la plante V22. L'un d'eux, compatible, prenant comme pollen celui de la plante tGFP 2548 et un autre, incompatible, prenant comme pollen celui de la plante tGFP 1022. La récolte des échantillons s'est fait 18 heures post-pollinisation (hpp) et 24 hpp. Les croisements sont faits vers 9h le matin par immersion du stigma dans le pollen frais recueilli dans un verre de montre.

### **2.3 Microscopie à fluorescence**

#### **2.3.1 Fixation au Carnoy**

Les fleurs ont été fixées dans une solution de Carnoy (Éthanol : Acide Acétique (3 :1)) pour une durée de 24h. Elles sont ensuite rincées à l'eau et mises dans une solution de NaOH 2N pendant 24h. Suite à un ultime rinçage toujours à l'eau, les styles ont été isolés et comprimés sous légère pression entre une lame de microscope contenant une goutte de bleu d'aniline et une lamelle (Matton *et al.* 1997).

### **2.3.2 Observations par microscopie à fluorescence**

Les observations ont été faites avec un microscope à fluorescence (ZEISS, SteREO Discovery V12). Les analyses des images numériques ont été faites sur ImageJ et comprenaient la mesure totale du style ainsi que la distance parcourue par les tubes polliniques formant le "peloton de tête" (excluant ainsi les tubes polliniques le plus rapides ou ceux trop lents.)

## **2.4 Microscopie électronique à transmission**

### **2.4.1 Fixation au formaldéhyde**

Les styles ont été retirés des fleurs aux temps déterminés (18h et 24h post pollinisation) et immergés rapidement dans une solution de PBS 0,1M pH 7,4. Ils sont par la suite coupés afin de ne conserver qu'une partie du style et le stigmate. L'endroit de la coupe varie selon le type de croisement et le temps post-pollinisation. Les échantillons issus de croisement compatible recueillis à 18h et 24 hpp et ceux issus de croisement incompatible toujours à 18h et 24h, ont été coupés à 1/2, 5/8, 1/4 et 1/3 de la longueur totale du style, respectivement. Ensuite, ils ont été placés dans une solution de fixation (PBS 0,1M pH 7,4 avec 4 % paraformaldéhyde) et mis sous vide pour une durée de 2h. Les styles ont été ensuite rincés 4 fois avec une solution de PBS 0,1M pH7,4. Chaque lavage a duré 15min.

### **2.4.2 Déshydratation et enrobage au LR-White**

Les échantillons sont ensuite déshydratés par trempages successifs dans des solutions d'alcool de plus en plus concentrées (solutions utilisées : Éthanol 30 % v/v, 50 % v/v, 70 % v/v, 95 % v/v et 100 % v/v). Chaque trempage a duré 1h. Les styles sont ensuite trempés dans des solutions successives de résine LR-White (solutions utilisées : LR-White 25 % v/v, 50 % v/v, 75 % v/v, 100 % v/v et encore une fois 100 %). Les temps d'enrobage varient selon la solution, et sont respectivement de 1 h, 2 h, 1 h, 1 h et 24 h. Après avoir encapsulé les échantillons avec de la nouvelle résine LR-White, ceux-ci sont mis dans un incubateur à 60 °C pour une durée de 24 h afin de permettre la polymérisation de la résine.

### **2.4.3 Coupe des échantillons**

Les échantillons sont ensuite coupés à l'ultra-microtome (Leica ultracut UCT). Les coupes de 70 nm sont déposées sur des grilles préalablement traitées avec une solution de Formvar (0,5 g Formvar dans 100 ml de chloroforme).

### **2.4.4 Immunomarquage de la S-RNase et de la callose**

Les coupes sont réhydratées par passage successif d'une minute dans des solutions d'éthanol de moins en moins concentrées (100 % v/v, 95 % v/v, 70 % v/v, 50 % v/v, 30 % v/v et 0 % v/v). Puis elles sont mises pour 15min dans une solution tampon de PBS 0,1 M pH 7,4 avec 3 % BSA (Bovine Serum Albumine) et 0,5 ml de tween 20.

Les coupes sont ensuite marquées avec un anticorps primaire anti-S<sub>11</sub>-RNase (développé par immunisation d'un lapin avec un peptide synthétique (KPKLTYNYFSDKMLN) correspondant à la région HVa de la S<sub>11</sub>-RNase -Cocalico Biological Inc., Reamstown, PA-)(Matton *et al.* 1999) et un anticorps primaire anti-callose (développé dans la souris) (Biosupplies Australia, (1-3)-B-D-gucan antibody, no 400-2) pendant 24 h. Ces anticorps sont reconnus respectivement par un anticorps secondaire anti-lapin couplé à des billes d'or de 20 nm (BBInternational, immunogold conjugate Em goat anti-rabbit IgG :20 nm, EM.GAR20) et un anticorps secondaire anti-souris couplé à des billes d'or de 10 nm (BBInternational, immunogold conjugate Em goat anti-mouse IgG :10 nm, EM.GAM10). Les traitements avec les anticorps secondaires ont duré 2 h à 25°C. Les anticorps autant primaires que secondaires sont dilués dans un rapport 1 :100 dans la solution tampon décrite précédemment. Entre l'anticorps primaire et l'anticorps secondaire ainsi qu'après l'anticorps secondaire, les coupes ont subi 3 lavages successifs de 1 min chacun dans cette même solution tampon. L'opération de marquage se termine par un trempage des coupes dans l'eau distillée pendant 5 min afin de dissoudre les sels pouvant s'être accumulés sur les échantillons.

## **2.4.5 Observation des coupes au microscope électronique à transmission**

Les coupes transversales sont observées au microscope électronique à transmission (JEOL Jem-1010) à des grossissements variant de 10 k à 50 k. Les photos prises au microscope sont ensuite numérisées et analysées à l'aide du logiciel ImageJ. L'analyse des photos comprend la mesure de surfaces et le dénombrement des billes d'or de 20 nm dans les régions suivantes : tubes polliniques (sans la paroi cellulaire), cellules du tissu de transmission et matrice extracellulaire du style. Puis la même analyse a été effectuée sur la surface cytoplasmique des tubes polliniques. La surface vacuolaire a été calculée par soustraction de la surface cytoplasmique à partir de la surface totale des tubes polliniques.

## **2.4.6 Les tests statistiques**

Des tests t de Student ont été effectués sur les résultats des graphiques présentés dans les figures 13 et 14. L'objectif de ces tests est de vérifier statistiquement que deux ensembles de données sont significativement différents au seuil  $\alpha \leq 0,01$ . Dans les figures 13 et 14, des crochets surmontés d'une étoile indique que les deux ensembles de données ont été testés par un test t de Student et qu'ils ont démontré des différences significatives. Les tests t de Student ont été effectués à l'aide du logiciel MS-Excel de la suite Microsoft Office 2003.

## **3. Résultats**

### **3.1 Cinétique de croissance des tubes polliniques**

Cette analyse vise à suivre la croissance des tubes polliniques dans le tissu de transmission du style dans le but de prévoir la position de l'apex des tubes polliniques compatibles ou incompatibles. La coloration au bleu d'aniline des styles fixés au Carnoy à des temps précis (6, 12, 18 et 24 h) après pollinisation, permet de visualiser la callose se trouvant dans la paroi interne des tubes polliniques; il est donc possible de mesurer la longueur de ceux-ci. Les analyses permettent de conclure que les tubes polliniques issus de croisements compatibles croissent plus vite que ceux issus de croisements incompatibles. Comme l'indique la figure 7, 18 heures après pollinisation, les tubes polliniques incompatibles ont parcouru 28 % de la longueur totale du style alors que dans un croisement compatible les tubes polliniques ont parcouru près de 70 % du style. Les tubes polliniques ayant poussé durant 24h, atteignent 30 % de la longueur du style dans un croisement incompatible par rapport à 90 % dans un croisement compatible (Figure 7). Ces résultats représentent la position des tubes polliniques les plus rapides. Afin de s'assurer de la présence de nombreux apex des tubes polliniques dans les échantillons pris pour la confection des coupes, les styles ont été coupés un peu avant la longueur maximale observée, soit 25 % (18 h incompatible), 50 % (18h compatible), 30 % (24h incompatible) et 65 % (24 h compatible) de la longueur du style. Ceci nous a permis d'effectuer des coupes dans une section du style où de nombreux apex des tubes polliniques sont présents.

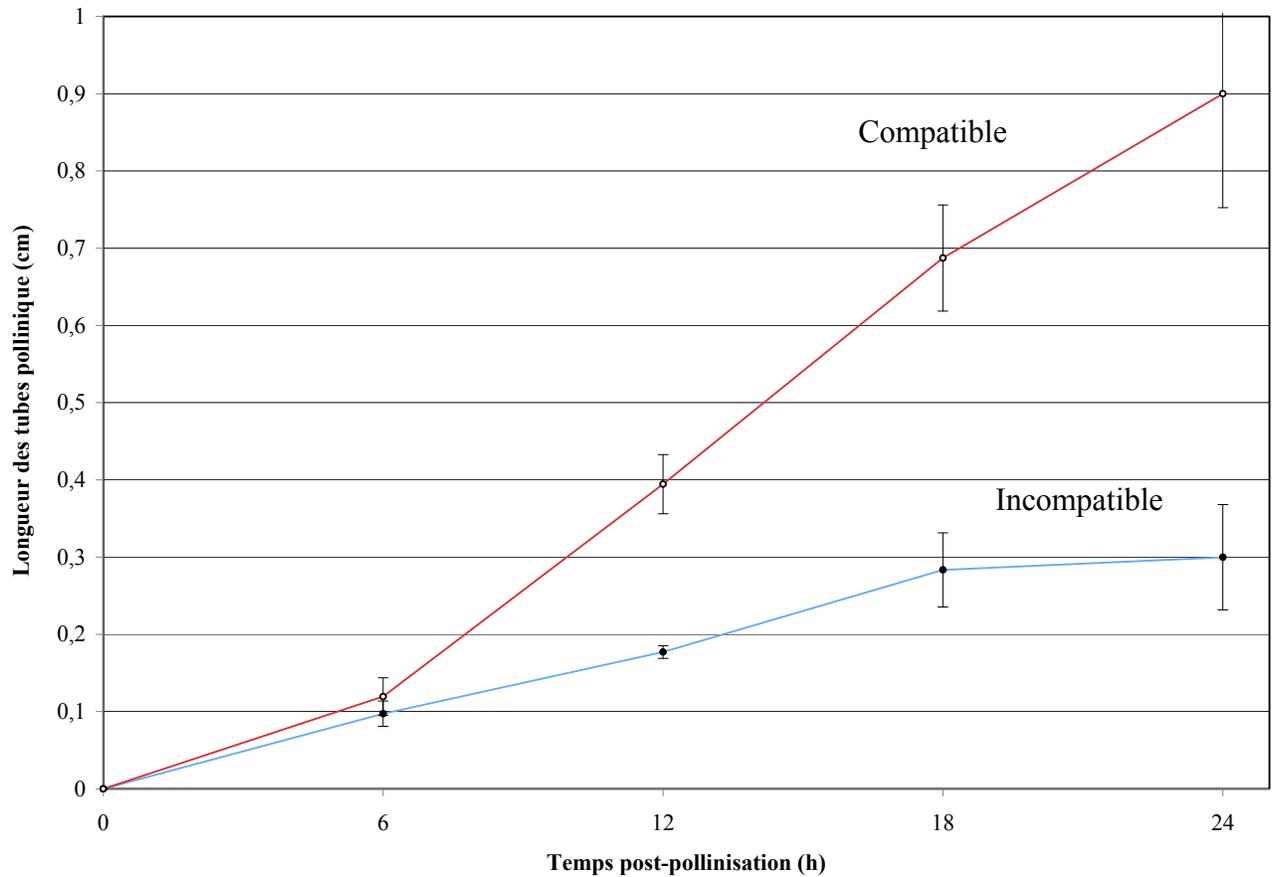


Figure 7 : **Croissance de tubes polliniques de *Solanum chacoense* en fonction du temps.** Longueur moyenne des tubes polliniques en condition compatible (2548xV22) et incompatible (2548x2548). Les mesures ont été prises toutes les 6h suite à la pollinisation, et les valeurs indiquent la moyenne  $\pm$  écart-type (n=6) des tubes polliniques observés dans les styles traités au bleu d’aniline avec un microscope binoculaire à fluorescence.

### **3.2 Morphologie du tissu de transmission envahi par les tubes polliniques**

Les micrographies des observations du style par microscopie électronique à transmission (Figure 8) montrent le plus souvent 3 régions distinctes : les tubes polliniques (TP), les cellules du tissu de transmission (TT) et la matrice extracellulaire (MEC). Ce sont sur ces trois régions que seront effectuées les mesures de surface, il est donc bien important de savoir les distinguer. Il est plutôt aisé de reconnaître la matrice extracellulaire. Pour ce qui est de reconnaître les tubes polliniques, ils sont plus petits des cellules du tissu de transmission (environ 2 à 3  $\mu\text{m}$  de diamètre contre 5  $\mu\text{m}$  et plus pour ces dernières), ont une forme irrégulière et possèdent une paroi très épaisse présentant deux couches : la paroi interne (PI) formée de callose et la paroi externe constituée de pectine (Geitmann et Steer 2006). Pour nous assurer d'une distinction efficace, nous avons utilisé un anticorps anti-callose qui marque leur paroi interne. Ce marquage prend la forme d'un nuage de billes de 10 nm qui entoure les tubes polliniques (flèche blanche Figures 8 à 12). Ce marquage semble inefficace chez certains tubes polliniques issus de croisements incompatibles qui ne possèdent pas de paroi interne ou alors qu'ils n'ont qu'une très mince paroi (Figure 12). Cette situation a également été décrite (Geitmann *et al.* 1995).

Il est aussi possible de distinguer le tissu de transmission envahi par de tubes polliniques incompatibles et celui envahi par les tubes compatibles. Ces différences s'observent à l'intérieur des tubes polliniques, mais aussi dans la matrice extracellulaire. Il est possible d'observer chez celle-ci des endroits présentant de structures ayant l'apparence de constituants cytoplasmiques (Figure 8). Puisque ces structures n'apparaissent que dans les cas de croisements incompatibles, une interprétation possible serait qu'elles représentent la résultante de l'éclatement de certains tubes polliniques qui, en déversant leur contenu cellulaire dans la matrice extracellulaire, modifient localement l'apparence de celle-ci. Ces structures seront nommées résidus de tube pollinique (RTP) (Figure 8). L'apparence spécifique de ces RTP ainsi que leur très haute densité en S-RNase (moyenne de  $20 \pm 10$  billes d'or/ $\mu\text{m}^2$ ;  $n=14$ ), nous ont induits à les exclure des mesures faites sur la matrice extracellulaire. Aucune mesure

d'aire ou dénombrement de billes d'or de ces résidus de tubes polliniques ne sont pris en considération dans les résultats de cette étude.

Une autre irrégularité observée dans toutes les coupes c'est une large bande blanche opaque qui semble séparer le cytoplasme de la paroi cellulaire chez certaines cellules. (Figure 8 à 12) Ce qui pourrait à première vue être interprété comme étant l'épaisse paroi de callose à cause de la ressemblance avec celle-ci, semble pourtant être un artéfact de fixation, possiblement dû à la déshydratation, puisqu'elle n'est pas marquée par l'anticorps anti-callose qui marque pourtant très efficacement la paroi interne des tubes polliniques.

### **3.3 Différentes morphologies des tubes polliniques**

Les tubes polliniques peuvent se présenter de diverses façons dans le tissu de transmission. Deux grandes catégories peuvent être distinguées: les tubes qui ont été coupés à travers l'apex (Figure 9 à 12), montrant un espace cellulaire contenant cytoplasme et vacuoles, et les tubes qui ont été coupés après un bouchon de callose, qui montrent un espace cellulaire (lumen) fort réduit (Figure 8). Cette seconde catégorie n'étant pas propice à l'analyse de la localisation des S-RNases, aucune mesure de surface ou dénombrement de bille d'or de ces tubes polliniques n'a été effectuée.

Pour ce qui est des tubes polliniques coupés à l'apex, la morphologie peut être différente selon le croisement et le temps post-pollinisation, mais chaque tube présente un marquage suffisant et des espaces vacuolaires et cytoplasmiques distincts. Les figures 9 à 12, nous présentent 4 micrographies représentant chacun des traitements étudiés, soit: un croisement compatible à 18 h (Figure 9) et 24 h (Figure 10) puis un croisement incompatible à 18 h (Figure 11) et 24 h (Figure 12).

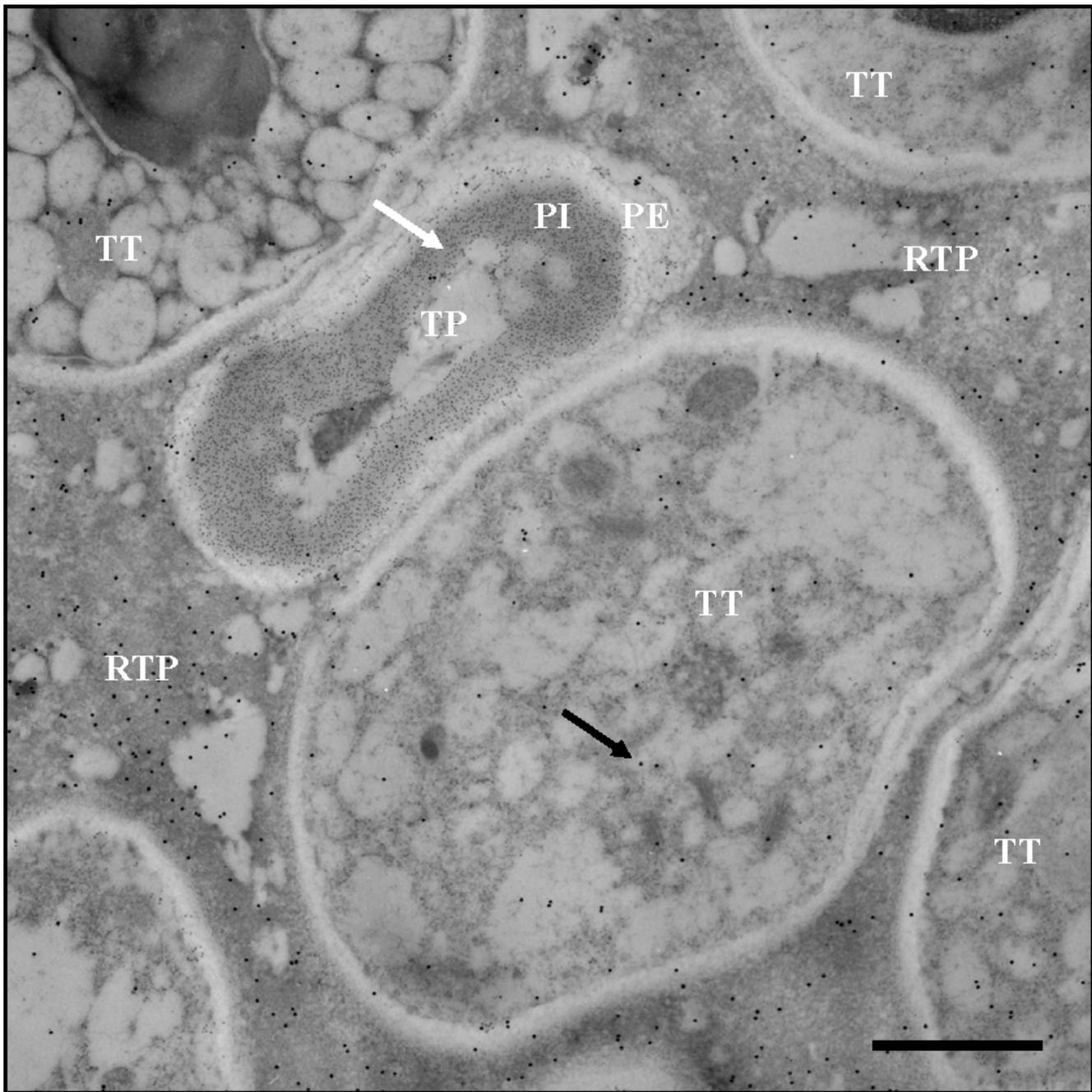


Figure 8 : **Micrographie d'une coupe transversale d'un style de *Solanum chacoense*, observée par microscopie électronique à transmission.** La S<sub>11</sub>-RNase est marquée par des billes d'or de 20 nm (flèche noire) et la callose par celles de 10 nm (flèche blanche). TP : Tube pollinique, PE : Paroi externe du tube pollinique, PI : Paroi interne du tube pollinique, TT Cellule du tissu de transmission, RTP : Résidu de tube pollinique. Échelle : 1µm



Figure 9 : Coupe transversale d'un style de *Solanum chacoense*, observée par microscopie électronique à transmission 18h après une pollinisation compatible. La S<sub>11</sub>-RNase est marquée par des billes d'or de 20 nm (flèche noire) et la callose par celles de 10 nm (flèche blanche). C : Espace cytoplasmique du tube pollinique; V : Espace vacuolaire du tube pollinique; PE : Paroi externe du tube pollinique; PI : Paroi interne du tube pollinique; TT Cellule du tissu de transmission; MEC : Matrice extracellulaire. Barre d'échelle : 1µm

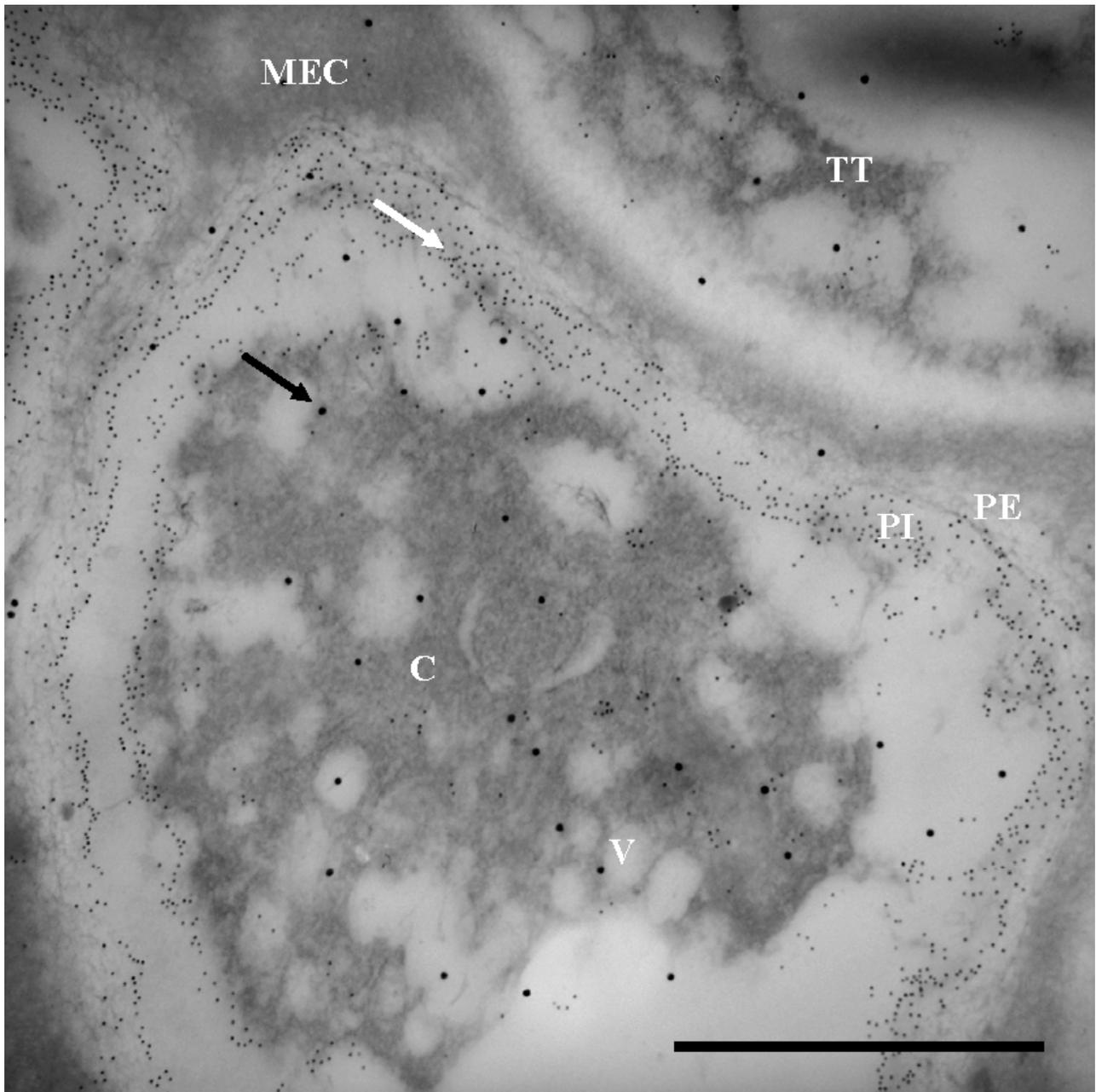


Figure 10 : Coupe transversale d'un style de *Solanum chacoense*, observée par microscopie électronique à transmission 24h après une pollinisation compatible. Les détails de l'identification du marquage, des structures et la barre d'échelle sont les mêmes que la figure 9.

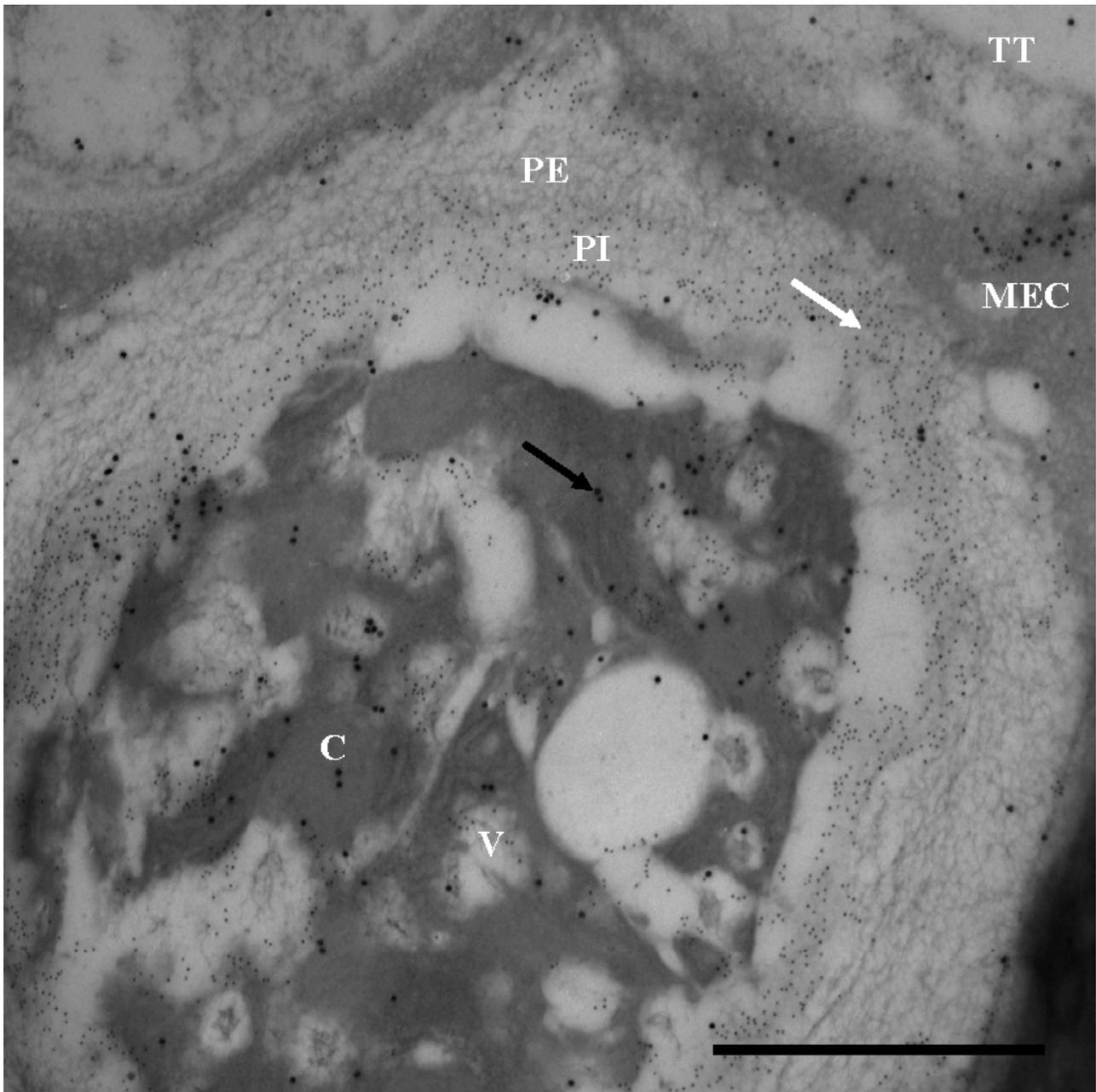


Figure 11 : Coupe transversale d'un style de *Solanum chacoense*, observée par microscopie électronique à transmission 18h après une pollinisation incompatible. Les détails de l'identification du marquage, des structures et la barre d'échelle sont les mêmes que la figure 9.

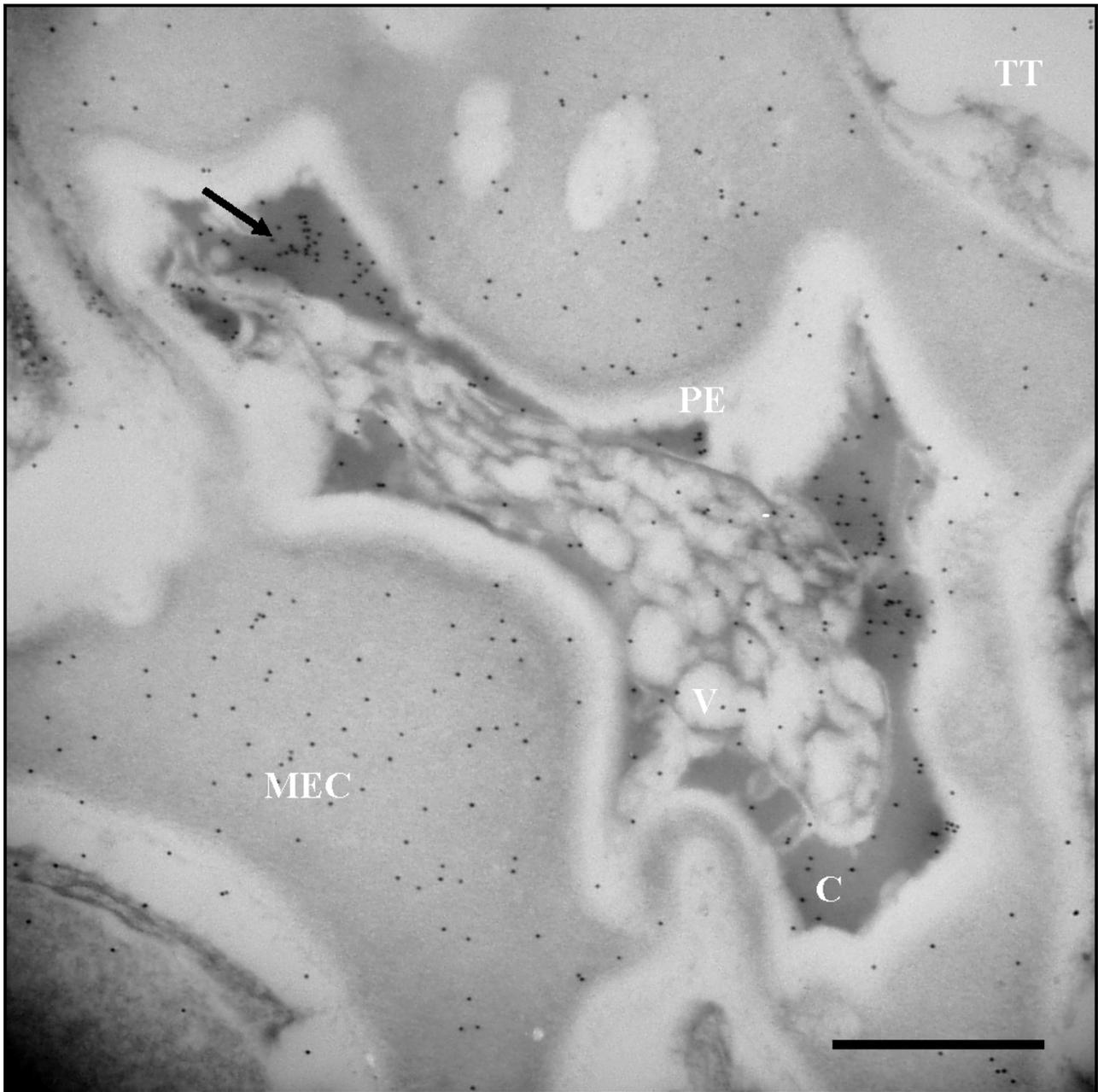


Figure 12 : Coupe transversale d'un style de *Solanum chacoense*, observée par microscopie électronique à transmission 24h après une pollinisation incompatible. Les détails de l'identification du marquage, des structures et la barre d'échelle sont les mêmes que la figure 9.

### **3.4 Densité de la S-RNase dans les différentes régions du tissu de transmission**

En ce qui concerne la distribution des molécules de la S<sub>11</sub>-RNase à travers le tissu de transmission, il est important de comparer sa densité entre les différentes régions de celui-ci. Cette densité est obtenue en divisant le nombre de billes d'or par la surface de chaque région examinée. Les structures étudiées sont les tubes polliniques, les cellules stylaires et la matrice extracellulaire.

Il est tout d'abord important de mentionner que l'absence de marquage observée au niveau de la résine LR-White ou sur la membrane de formvar (marquage  $< 0,3$  bille/ $\mu\text{m}^2$  dans les cellules corticales du style) indique que nos anticorps, autant primaires que secondaires, sont spécifiques aux protéines de la région ciblée soit la région du tissu de transmission. Toutefois, il n'y a pas de structure qui nous permette une standardisation stricte du marquage. Malgré cette limitation, nos observations ont révélé qu'au niveau des cellules du tissu de transmission la densité de la S-RNase ne varie pas de façon significative (selon test t de Student;  $p \leq 0,01$ ) pour l'ensemble des paramètres étudiés (18 et 24 hpp, croisements compatibles et incompatibles) (Figure 13). La densité de la S-RNase de la matrice extracellulaire dans les cas de compatibilité 24 hpp semble tout de même moindre, cette variation est significative (Figure 13).

Par contre, la densité de la S-RNase varie entre les différents traitements des tubes polliniques (Figure 13). Dans les tubes polliniques compatibles 18 hpp la densité de S-RNase est significativement plus grande que celle du tissu de transmission (Figure 13). Dans les tubes polliniques compatibles 24 hpp cette densité ne diffère pas à celle des autres structures (selon test t de Student;  $p \leq 0,01$ ), tandis que dans des tubes incompatibles elle dépasse largement celle des autres structures (Figure 13). Ce résultat confirme que la réaction d'incompatibilité est bel et bien associée à une grande densité de S-RNase dans les tubes polliniques.

### **3.5 Densité de la S-RNase dans les différents espaces du tube pollinique**

Dans la poursuite de notre analyse, nous avons concentré nos observations sur deux espaces à l'intérieur du tube pollinique : l'espace vacuolaire et l'espace cytoplasmique. Les espaces vacuolaires se présentent comme des zones de couleur plus pâle alors que les zones cytoplasmiques sont plus foncées (Figure 8 à 12). Cette différence est probablement due à la concentration élevée en protéines dans le cytoplasme, ce qui le fait paraître plus opaque à la microscopie électronique (Figure 8 à 12). Il est alors possible de mesurer la surface des espaces cytoplasmiques et vacuolaires pour y déterminer la densité de S-RNase pour chacun des paramètres étudiés (18 et 24 hpp, croisements compatibles et incompatibles). La figure 14 montre les résultats de cette analyse.

Notons tout d'abord que les valeurs des espaces cellulaires (gris très foncé) dans la figure 14 sont les mêmes que ceux de la région appelée tube pollinique de la figure 13. Les tubes polliniques issus de croisements compatibles montrent une différence significative entre leur densité de S-RNase vacuolaire qui atteint  $15,6 \pm 1,9$  billes d'or/ $\mu\text{m}^2$  (18h compatible) et  $5,3 \pm 3,0$  billes d'or/ $\mu\text{m}^2$  (24h compatible), et la densité de S-RNase cytoplasmique qui est très faible (Figure 14). Cette différence significative de densité se voit aussi au niveau des tubes polliniques issus de croisements incompatibles 24 hpp, mais dans ce cas, c'est la densité de la S-RNase cytoplasmique qui est plus de deux fois plus grande que la densité de la S-RNase vacuolaire (Figure 14). Quant aux tubes incompatibles 18 hpp, la densité de la S-RNase cytoplasmique ne diffère pas de celle vacuolaire (selon test t de Student;  $p \leq 0,01$ ) (Figure 14).

Par ailleurs, la densité de la S-RNase vacuolaire semble rester constante peu importe le traitement, sauf le cas des tubes compatibles 24 hpp où la densité est significativement moindre (Figure 14). Cette diminution explique la densité dans l'espace cellulaire significativement plus basse dans les tubes compatibles 24 hpp par rapport à ceux du même type de croisement 18 hpp (Figure 13). Puisqu'une S-RNase vacuolaire ne peut pas induire une réaction d'incompatibilité, il est donc judicieux de prêter une plus grande attention aux S-RNases cytoplasmiques pouvant être en contact avec Pollen-S.

La figure 14 montre le lien entre la réaction d'incompatibilité et la densité cytoplasmique de la S-RNase puisque cette densité est faible dans les tubes polliniques compatibles et forte dans ceux incompatibles. Par contre, le lien entre la réaction d'incompatibilité et la densité vacuolaire de la S-RNase ne peut être clairement établi (Figure 14). Les mécanismes menant à l'explication du lien entre densité cytoplasmique et incompatibilité seront détaillés dans la discussion.

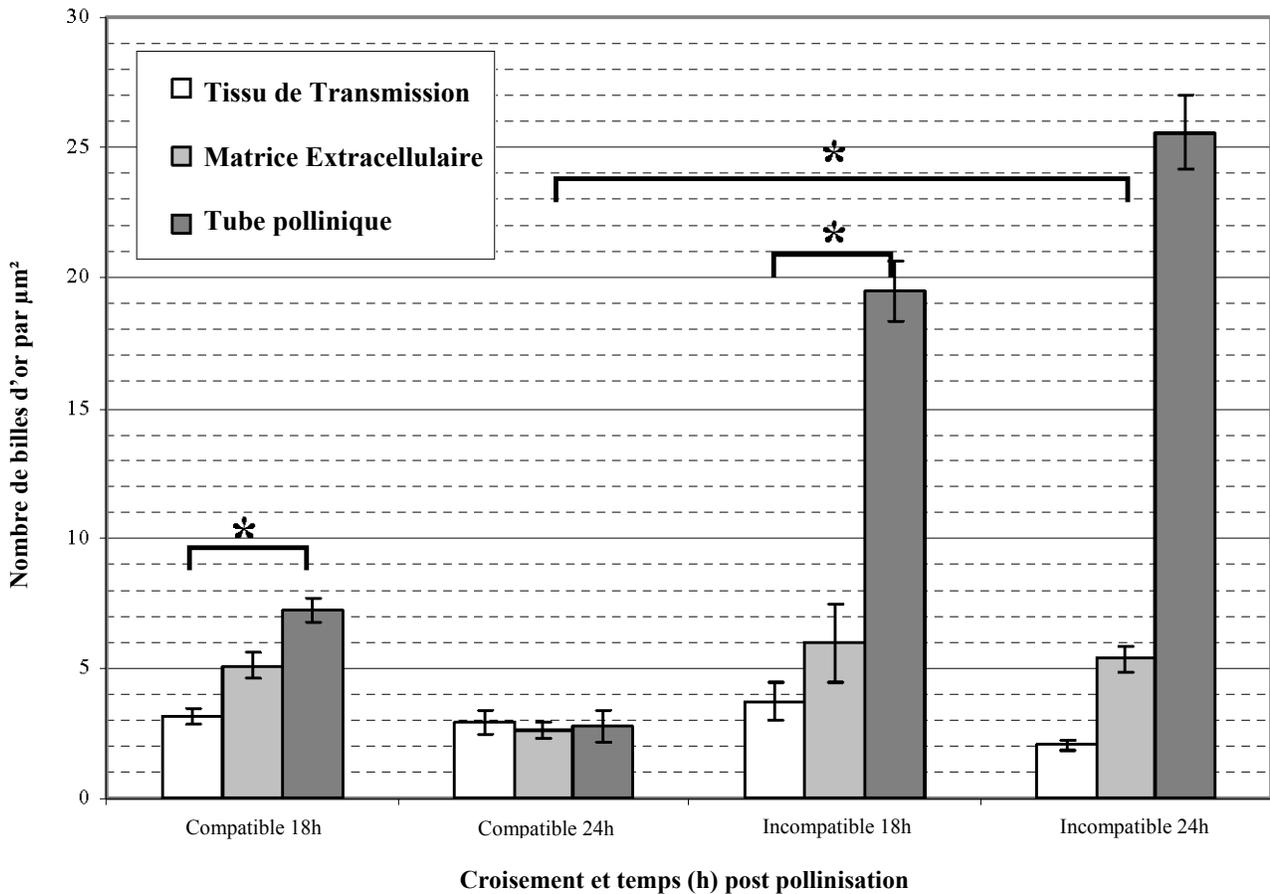


Figure 13 : **Densité de billes d’or liées à la S<sub>11</sub>-RNase au niveau de trois régions du tissu de transmission.** Les mesures sont effectuées sur les tubes polliniques (sans la paroi cellulaire), les cellules stylaires et la matrice extracellulaire observés sur l’ensemble des micrographies semblable aux figures 9 à 12. Les valeurs illustrées sont des moyennes  $\pm$  l’erreur-type de mesures d’aire et de dénombrements de billes effectués sur 6 ou 7 micrographies. \* : indique que les données pointées par le crochet sont significativement différentes selon un test t de Student au seuil  $\alpha \leq 0,01$ .

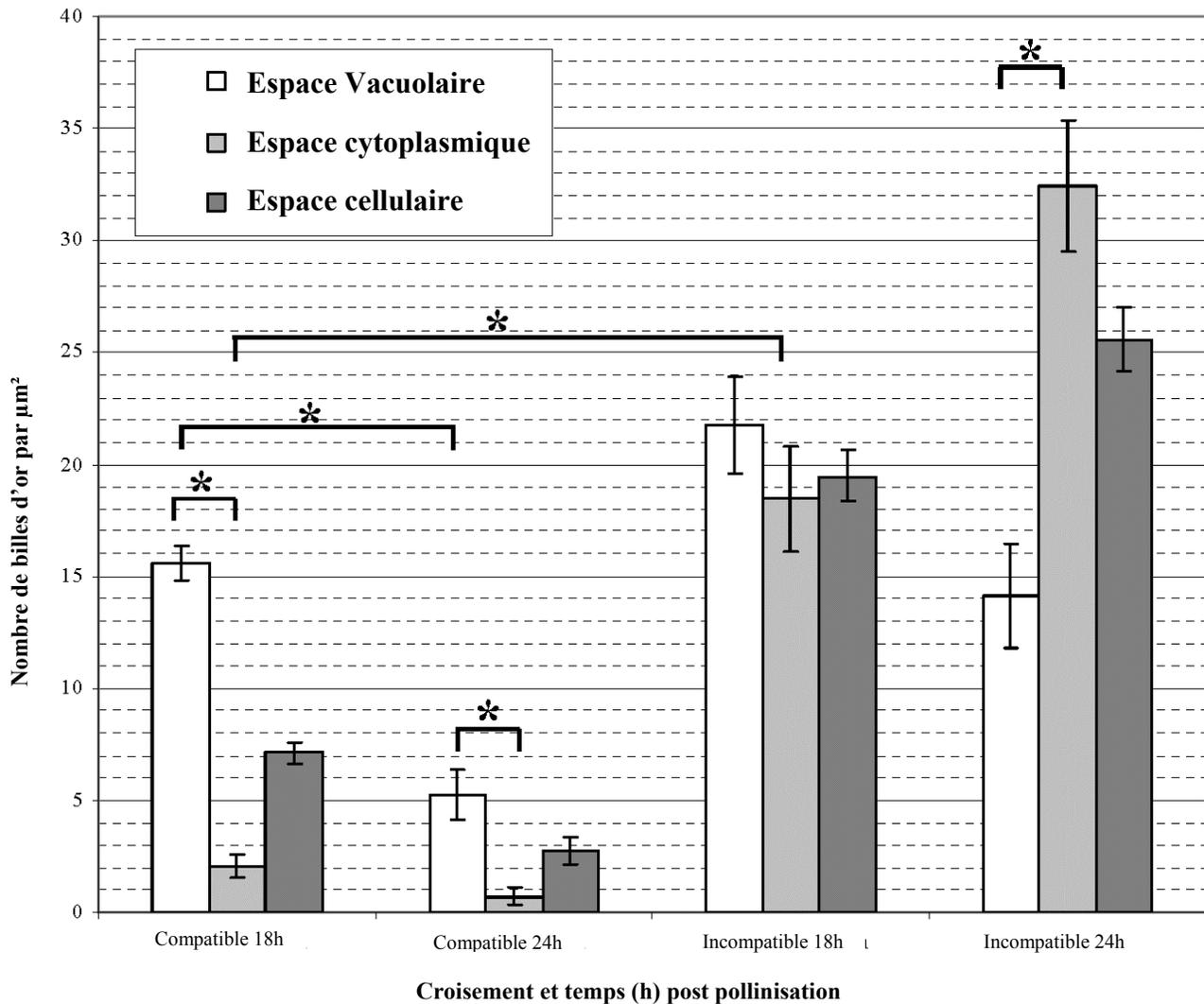


Figure 14 : **Densité de billes d'or liées à la S<sub>11</sub>-RNase dans les vacuoles et le cytoplasme des tubes polliniques.** L'espace cellulaire correspond à l'ensemble du protoplasme du tube pollinique (Cytoplasme + Vacuoles). Les mesures sont effectuées sur les tubes polliniques, la cellule stylaire et la matrice extracellulaire observés sur l'ensemble des micrographies semblable aux figures 9 à 12. Les valeurs illustrées sont des moyennes  $\pm$  l'erreur-type de mesures d'aire et de dénombrements de billes effectués sur 6 ou 7 micrographies. \* : indique que les données pointées par le crochet sont significativement différentes selon un test t de Student au seuil  $\alpha \leq 0,01$ .

## **4. Discussion**

### **4.1 L'environnement des tubes polliniques**

Les tubes polliniques qui traversent le style y trouvent une concentration en S-RNases similaire dans toutes nos expériences (Figure 13). On déduit, à partir de cette observation, qu'il n'y a pas une augmentation de la concentration de S-RNase en réponse au pollen incompatible, dans le tissu de transmission qui pourrait expliquer la réaction d'auto-incompatibilité. Le style offre plutôt un défi constant à tous les tubes polliniques qui, selon leur constitution au locus-S, c'est-à-dire leur haplotype, pourront outrepasser ce tissu (tubes compatibles) ou y être bloqués (tubes incompatibles).

Dans le cas des croisements incompatibles, il est possible d'observer dans la matrice extracellulaire des zones de haute densité en S-RNases. Ces zones n'ont pas été utilisées pour les calculs de la concentration de S-RNase dans la matrice parce qu'ils présentent aussi ce qui ressemble à du contenu cellulaire (Figure 8). Dans un rapport (Herrero et Dickinson 1981), ces zones sont interprétées comme étant des cellules du tissu de transmission qui aurait éclaté lors du passage des tubes polliniques. Or, nous en faisons une interprétation différente basée sur l'observation que la densité en S-RNase de ces régions, tel que démontré par notre anticorps ne diffère pas de celle retrouvée dans les tubes polliniques incompatibles (selon test t de Student;  $p \leq 0,01$ ) (Figure 8, 11 et 12). Notre hypothèse serait qu'il s'agit plutôt de tubes polliniques ayant éclaté et qui déverseraient leur contenu cytoplasmique dans la matrice extracellulaire.

### **4.2 Internalisation des S-RNases par les tubes polliniques**

#### **4.2.1 Les S-RNases vacuolaires**

La densité de la S-RNase vacuolaire ne varie significativement que lors des croisements compatibles 24 heures post-pollinisation (hpp) (Figure 14). La similarité générale entre les trois autres échantillons est probablement due au fait que la S-RNase serait internalisée dans le tube pollinique via le transport vésiculaire (endocytose non-sélective) et

que la quantité de S-RNase vacuolaire représenterait la prise non sélective des S-RNase dans le tube pollinique. Cette hypothèse soutiendrait qu'il n'y a pas de récepteurs spécifiques à la S-RNase, qui entrerait dans le tube pollinique lors des événements de « kiss and run » et de l'endocytose des constituants de la matrice extracellulaire nécessaires à la croissance du tube pollinique. Cette hypothèse explique pourquoi la densité de S-RNase vacuolaire est relativement semblable chez les tubes polliniques issus de croisements compatibles 18 hpp et incompatibles aux deux temps 18 et 24 hpp (Figure 13).

Dans le cas des tubes polliniques 24 hpp issus d'un croisement compatible, la densité de la S-RNase vacuolaire semble être plus basse que dans les trois autres échantillons (Figure 14). Ceci pourrait s'expliquer si l'internalisation des S-RNases est moindre, une idée supportée par la densité significativement plus basse de la S-RNase que nous observons dans la matrice extracellulaire (Figure 13). Ceci est intéressant, étant donné que les analyses faites par notre laboratoire (Liu *et al.* 2009) ont permis de montrer une baisse d'ARNm codant pour la S-RNase dans les cellules du style des croisements compatibles, ce qui suggère une rétroaction négative. Malgré ceci, nous privilégions une explication qui implique la dégradation des S-RNases telle qu'expliquée plus bas.

#### **4.2.2 Séquestration des S-RNase**

Chez *Nicotiana*, la rétention de la S-RNase dans la vacuole (Goldraij *et al.* 2006) a permis l'élaboration de l'hypothèse de la séquestration. Bien que nos résultats soient cohérents avec une distribution vacuolaire des S-RNases, nous ne pouvons pas confirmer le modèle tel que décrit. Ce modèle prédit qu'une fuite considérable des S-RNases vers le compartiment cytoplasmique va avoir eu lieu seulement dans les croisements incompatibles, ce qui amènerait la densité de S-RNases vacuolaire à diminuer. Nous voyons en effet une plus faible densité (quoi que pas significative selon test t de Student;  $p \leq 0,01$ ) de la S-RNase vacuolaire à 24 hpp comparée à 18 hpp pour des croisements incompatibles (Figure 14). Ce modèle prédit, par contre, une accumulation de la S-RNase vacuolaire dans les tubes compatibles. Cependant, nous n'avons pas observé cet écart de densité vacuolaire anticipée entre les tubes compatibles à 24 hpp et ceux des croisements incompatibles.

### **4.3 Les S-RNases cytoplasmiques : véritables agents de l'auto-incompatibilité**

L'observation que la densité des S-RNase cytoplasmique augmentant dans les croisements incompatibles suggère qu'il y a déversement des S-RNases de leur compartiment vacuolaire vers le cytoplasme. Cette hypothèse est supportée par la diminution des S-RNases vacuolaires dans les deux types de croisements 24hpp (Figure 14). Cette fuite doit être considérable parce qu'une diminution de jusqu'à 30 % des S-RNases stylaires a été mesurée dans des styles issus de croisements compatibles (Liu *et al.* 2009).

L'observation de la densité de S-RNases cytoplasmiques des tubes issus de croisements compatibles (Figure 14) supporte évidemment l'idée de la dégradation. L'interaction des SLFs avec les S-RNases n'étant possible que dans le cytoplasme, la faible densité de S-RNase cytoplasmique et la nature F-box des SLF suggèrent que cette interaction devrait mener à la dégradation des S-RNase seulement dans les tubes compatibles. La S-RNase fuyant la vacuole serait alors reconnue par une SLF non-self, avec qui elle établira des interactions fortes menant à l'ubiquitination et la subséquente dégradation par le protéasome 26S. Cette dégradation continuelle des S-RNases cytoplasmiques explique leur faible densité dans le cytoplasme des tubes polliniques compatible que nous observons (Figure 14).

Dans le cas où une S-RNase est non-reconnue (ou établi seulement avec des interactions faibles) par les SLFs, elle échappe à la dégradation. Puisque la densité des S-RNases vacuolaires n'est pas significativement plus basse dans les tubes incompatibles 18 hpp (Figure 14), la vitesse avec laquelle les S-RNases vacuolaires entrent dans le cytoplasme semble donc être constante. L'absence d'interactions fortes entre ces S-RNases et les SLFs serait donc responsable de leur accumulation dans le cytoplasme. L'absence de dégradation explique pourquoi la densité de marquage observée pour les S-RNases cytoplasmiques est significativement plus haute dans les tubes incompatibles que dans ceux compatibles (Figure 14). Puisque la S-RNase est non-dégradée, elle pourrait donc dégrader l'ARN ribosomal menant à l'inhibition de la traduction des protéines polliniques. Ceci va conduire

inévitablement vers une très grande décélération de la croissance du tube pollinique, son arrêt ou même l'éclatement de sa partie apicale.

Nos études ne peuvent pas nous informer sur le sort de la protéine HT-B, car nous n'avons pas des anticorps permettant sa détection. Par contre, si son rôle est de déstabiliser les membranes des vacuoles contenant les S-RNases, on s'attendrait à voir moins de vacuoles dans les tubes polliniques incompatibles. Or, ceci ne semble pas être le cas, car on voit autant des espaces que l'on peut interpréter comme étant vacuolaires dans les deux types de croisements. La superficie totale vacuolaire ne varie pas significativement entre les tubes polliniques compatibles et incompatibles 24 hpp ( $p \leq 0,01$  selon un test t de Student).

## 5. Conclusions

Cette étude a permis de mettre en évidence certains mécanismes de la réaction d'AI tout en laissant sans quelques questions sans réponse. À la lumière de nos résultats, la réaction d'AI semble être étroitement liée à la concentration de S-RNase cytoplasmique. Une faible concentration des S-RNases cytoplasmiques permet au tube de croître alors qu'une concentration plus forte cause le ralentissement et l'arrêt du tube. Le mécanisme qui entretient cette faible concentration des S-RNase cytoplasmique serait lié à leur interaction de type forte avec SLF, ce qui les mènerait à leur dégradation. Finalement en absence de ce mécanisme de régulation, les S-RNases peuvent s'accumuler dans le cytoplasme ce qui mène à l'arrêt du tube pollinique.

Il n'est pas possible, par contre, de clairement identifier le rôle de HT-B, supposément impliqué dans la déstabilisation des membranes vacuolaires. Un anticorps anti-HT-B aurait été nécessaire pour pouvoir tirer quelque conclusion quant à son rôle dans le mécanisme d'AI. Le mode et la quantité de la fuite des S-RNases vacuolaires restent aussi indéterminés. Bien que nos résultats semblent indiquer une fuite substantielle, elle n'a pas été mesurée directement et ne reste qu'une hypothèse ne donnant aucune indication sur son mécanisme.

Des expériences menant à la co-localisation entre une protéine vacuolaire et la S-RNase pourraient jeter la lumière sur cette situation ambiguë. Hélas, tous nos efforts pour marquer une GFP vacuolaire avec un anticorps anti-GFP n'ont jamais porté fruit. D'autres expériences devraient être tentées pour comprendre le comportement des S-RNases vacuolaires et leur contribution au phénomène d'AI.

## Bibliographies

**Amor, Y., C. H. Haigler, S. Johnson, M. Wainscott and D. P. Delmer** (1995), *A membrane-associated form of sucrose synthase and its potential role in synthesis of cellulose and callose in plants*. Proceedings of the National Academy of Science, 92 : 9353-9357.

**Anderson, M., E. Cornish, S.-L. Mau, E. Williams, R. Hoggart, A. Atkinson, I. Bonig, B. Grego, R. Simpson, P. Roche, J. Haley, J. Penschow, H. Niall, G. Tregear, J. Coghlan, R. Crawford and A. Clarke** (1986), *Cloning of cDNA for a stylar glycoprotein associated with expression of self-incompatibility in Nicotiana glauca*. Nature, 321: 38-44.

**Bove, J., B. Vaillancourt, J. Kroeger, P. K. Hepler, P. W. Wiseman and A. Geitmann** (2008), *Magnitude and direction of vesicle dynamics in growing pollen tubes using spatiotemporal image correlation spectroscopy and fluorescence recovery after photobleaching*. Plant Physiology, 147: 1646-1658.

**Bredemeyer, G. M. M. and J. Blaas** (1981), *S-specific proteins in styles of self-incompatible Nicotiana glauca*. Theoretical Applied Genetics, 59: 429-434.

**Brownfield, L., S. Wilson, E. Newbigin, A. Bacic and S. Read** (2008), *Molecular control of the glucan synthase-like protein NaGSL1 and callose synthesis during growth of Nicotiana glauca pollen tubes*. Biochemical Journal, 414: 43-52.

**Cai, G., C. Faleri, C. Del Casino, A. M. Emons and M. Cresti** (2011), *Distribution of callose synthase, cellulose synthase, and sucrose synthase in tobacco pollen tube is controlled in dissimilar ways by actin filaments and microtubules*. Plant Physiology, 155: 1169-1190.

**Cai, G., S. Romagnoli, A. Moscatelli, E. Ovidi, G. Gambellini, A. Tiezzi and M. Cresti** (2000), *Identification and characterization of a novel microtubule-based motor associated with membranous organelles in tobacco pollen tubes*. The Plant Cell, 12: 1719-1736.

**Certal, A. C., R. B. Almeida, L. M. Carvalho, E. Wong, N. Moreno, E. Michard, J. Carneiro, J. Rodriguez-Leon, H. M. Wu, A. Y. Cheung and J. A. Feijo** (2008), *Exclusion of a proton ATPase from the apical membrane is associated with cell polarity and tip growth in Nicotiana glauca pollen tubes*. The Plant Cell, 20: 614-634.

**Chebli, Y., M. Kaneda, R. Zerzour and A. Geitmann** (2012), *The cell wall of the Arabidopsis pollen tube--spatial distribution, recycling, and network formation of polysaccharides*. Plant Physiology, 160: 1940-1955.

**Chebli, Y., J. Kroeger and A. Geitmann** (2013), *Transport logistics in pollen tubes*. Molecular Plant, 6: 1-36.

**Clarke, A. E., M. A. Anderson, A. Atkinson, A. Bacic, P. R. Ebert, W. Jahnen, W. M. Lush, S. L. Mau and J. R. Woodward** (1989), *Recent developments in the molecular genetics and biology of self-incompatibility*. Plant Molecular Biology, 13: 267-271.

**Cresti, M., E. Pacini, F. Ciampolini and G. Sarfatti** (1977), *Germination and early tube development in vitro of Lycopersicum peruvianum pollen; ultrastructural features.*, *Planta*, 136: 239-247.

**de Graaf, B. H., B. A. Knuiman, G. M. Van der Weerden, R. Feron, J. Derksen and C. Mariani** (2004), *The PELP III glycoproteins in Solanaceae: stylar expression and transfer into pollen tube walls.*, *Sexual Plant Reproduction*, 16: 245-252.

**de Nettancourt, D.** (1977), *Incompatibility in Angiosperms.* Berlin, Springer Verlag.

**de Nettancourt, D.** (1997), *Incompatibility in Angiosperms.*, *Sexual Plant Reproduction*, 10: 185 -199.

**de Nettancourt, D.** (2001), *Incompatibility and Incongruity in Wild and Cultivated Plants.* Berlin, Springer-Verlag.

**Derksen, J., T. Rutten, I. K. Lichtscheidl, A. H. N. deWin, P. E.S. and G. Rongen** (1995), *Quantitative analysis of the distribution of organelles in tobacco pollen tubes: implications for exocytosis and endocytosis.* *Protoplasma*, 188: 267–276.

**Desh, P. S. V. and Z. Hong** (2001), *Plant callose synthase complexes.* *Plant Molecular Biology*, 47: 693-701.

**Franklin-Tong, V. E.** (1999), *Signaling and the Modulation of Pollen Tube Growth.* *The Plant Cell*, 11: 727-738.

**Geitmann, A., J. Hudák, F. Vennigerholz and B. Walles** (1995), *Immunogold localization of pectin and callose in pollen grains and pollen tubes of Brugmansia suaveolens – implications for the self-incompatibility reaction.*, *Plant Physiology*, 147: 225-234.

**Geitmann, A. and M. Steer** (2006), *The Architecture and Properties of the Pollen Tube CellWall.* *Plant cell monographs*, 3: 177-200.

**Goldraij, A., K. Kondo, C. B. Lee, C. N. Hancock, M. Sivaguru, S. Vazquez-Santana, S. Kim, T. E. Phillips, F. Cruz-Garcia and B. McClure** (2006), *Compartmentalization of S-RNase and HT-B degradation in self-incompatible Nicotiana.* *Nature*, 439: 805-810.

**Gray, J., B. McClure, I. Bönig, M. Anderson and A. Clarke** (1991), *Action of the style product of the self-incompatibility gene of Nicotiana alata (S-RNase) on in vitro grown pollen tubes.*, *The Plant Cell*, 3: 271-283.

**Herrero, M. and H. G. Dickinson** (1979), *Pollen-pistil incompatibility in Petunia hybrida. Changes in the pistil following compatible and incompatible intraspecific crosses.* *cell science*, 36: 1-18.

- Herrero, M. and H. G. Dickinson** (1981), *Pollen tube development in Petunia hybrida following compatible and incompatible intraspecific matings*. J Cell Sci, 47: 365-383.
- Hershko, A. and A. Ciechanover** (1998), *The ubiquitin system*. Annual Review of Biochemistry, 67: 425-479.
- Hua, Z. and T. H. Kao** (2006), *Identification and characterization of components of a putative petunia S-locus F-box-containing E3 ligase complex involved in S-RNase-based self-incompatibility*. The Plant Cell, 18: 2531-2553.
- Hua, Z. and T. H. Kao** (2008), *Identification of major lysine residues of S(3)-RNase of Petunia inflata involved in ubiquitin-26S proteasome-mediated degradation in vitro*. The Plant Journal , 54: 1094-1104.
- Hua, Z., X. Meng and T. H. Kao** (2007), *Comparison of Petunia inflata S-Locus F-box protein (Pi SLF) with Pi SLF like proteins reveals its unique function in S-RNase based self-incompatibility*. The Plant Cell, 19: 3593-3609.
- Hua, Z. H., A. Fields and T. H. Kao** (2008), *Biochemical models for S-RNase-based self-incompatibility*. Molecular Plant, 1: 575-585.
- Huang, S., H.-S. Lee, B. Karunanandaa and T.-h. Kao** (1994), *Ribonuclease activity of Petunia inflata S proteins is essential for rejection of self pollen*. The Plant Cell, 6: 1021-1028.
- Ioerger, T., J. Gohlke, B. Xu and T.-H. Kao** (1991), *Primary structural features of the self-incompatibility protein in solanaceae*. Sexual Plant Reproduction, 4: 81-87.
- Ishimizu, T., M. Miyagi, S. Norioka, Y. H. Liu and A. E. Clarke** (1995), *Identification of histidine 31 and cysteine 95 in the active site of self-incompatibility associated S6-RNase in Nicotiana glauca*. Journal of Biochemistry, 118: 1007-1013.
- Jahnen, W., W. M. Lush and A. E. Clarke** (1989), *Inhibition of Invitro Pollen-Tube Growth by Isolated S-Glycoproteins of Nicotiana-Alata*. The Plant Cell, 1: 501-510.
- Kachroo, A., C. R. Schopfer, M. E. Nasrallah and J. B. Nasrallah** (2001), *Allele-specific receptor-ligand interactions in Brassica self-incompatibility*. Science, 293: 1824-1826.
- Kao, T. H. and A. G. McCubbin** (1996), *How flowering plants discriminate between self and non-self pollen to prevent inbreeding*. Proc Natl Acad Sci U S A, 93: 12059-12065.
- Kubo, K., T. Entani, A. Takara, N. Wang, A. M. Fields, Z. Hua, M. Toyoda, S. Kawashima, T. Ando, A. Isogai, T. H. Kao and S. Takayama** (2010), *Collaborative non-self recognition system in S-RNase-based self-incompatibility*. Science, 330: 796-799.

**Lai, Z., W. Ma, B. Han, L. Liang, Y. Zhang, G. Hong and Y. Xue** (2002), *An F-box gene linked to the self-incompatibility (S) locus of Antirrhinum is expressed specifically in pollen and tapetum*. *Plant Molecular Biology*, 50: 29-42.

**Lee, H. S., S. Huang and T. Kao** (1994), *S proteins control rejection of incompatible pollen in Petunia inflata*. *Nature*, 367: 560-563.

**Li, Y. Q., A. Mareck, C. Faleri, A. Moscatelli, Q. Liu and M. Cresti** (2002), *Detection and localization of pectin methylesterase isoforms in pollen tubes of Nicotiana tabacum L.* *Planta*, 214: 734-740.

**Liu, B., D. Morse and M. Cappadocia** (2009), *Compatible pollinations in Solanum chacoense decrease both S-RNase and S-RNase mRNA*. *PLoS One*, 4: e5774.

**Luu, D., X. Qin, D. Morse and M. Cappadocia** (2000), *S-RNase uptake by compatible pollen tubes in gametophytic self-incompatibility.*, *Nature*, 407: 649-651.

**Luu, D. T., X. Qin, G. Laublin, Q. Yang, D. Morse and M. Cappadocia** (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.

**Matton, D. P., D. T. Luu, Q. Xike, G. Laublin, M. O'Brien, O. Maes, D. Morse and M. Cappadocia** (1999), *Production of an S RNase with dual specificity suggests a novel hypothesis for the generation of new S alleles*. *The Plant Cell*, 11: 2087-2097.

**Matton, D. P., C. Maes, G. Laublin, X. K. Qin, C. Bertrand, D. Morse and M. Cappadocia** (1997), *Hypervariable domains of self-incompatibility RNases mediate allele-specific pollen recognition*. *The Plant Cell*, 9: 1757-1766.

**Matton, D. P., O. Maes, G. Laublin, Q. Xike, C. Bertrand, D. Morse and M. Cappadocia** (1997), *Hypervariable Domains of Self-Incompatibility RNases Mediate Allele-Specific Pollen Recognition*. *The Plant Cell*, 9: 1757-1766.

**McClure, B.** (2006), *New views of S-RNase-based self-incompatibility*. *Current Opinion in Plant Biology*, 9: 639-646.

**McClure, B., F. Cruz-Garcia and C. Romero** (2011), *Compatibility and incompatibility in S-RNase-based systems*. *Annals of Botany*, 108: 647-658.

**McClure, B. A., V. Haring, P. R. Ebert, M. A. Anderson, R. J. Simpson, F. Sakiyama and A. E. Clarke** (1989), *Style self-incompatibility gene products of Nicotiana glauca are ribonucleases*. *Nature*, 342: 955-957.

**Meng, X., Z. Hua, N. Wang, A. M. Fields, P. E. Dowd and T. H. Kao** (2009), *Ectopic expression of S-RNase of Petunia inflata in pollen results in its sequestration and non-cytotoxic function*. Sexual Plant Reproduction, 22: 263-275.

**Meng, X., P. Sun and T. H. Kao** (2011), *S-RNase-based self-incompatibility in Petunia inflata*. Annals Botany, 108: 637-646.

**Moon, J., G. Parry and M. Estelle** (2004), *The ubiquitin-proteasome pathway and plant development*. The Plant Cell, 16: 3181-3195.

**Moscatelli, A., G. Cai, F. Ciampolini and M.**

**Cresti** (1998), *Dynein heavy chain-related polypeptides are associated with organelles in pollen tubes of Nicotiana tabacum.*, Sexual Plant Reproduction, 11: 31-40.

**O'Brien, M., C. Kapfer, G. Major, M. Laurin, C. Bertrand, K. Kondo, Y. Kowiyama and D. P. Matton** (2002), *Molecular analysis of the stylar-expressed Solanum chacoense small asparagine-rich protein family related to the HT modifier of gametophytic self-incompatibility in Nicotiana*. The Plant Journal, 32: 985-996.

**O'Brien, M., G. Major, C. Sier-Ching and D. P. Matton** (2004), *Isolation of S-RNase binding proteins from Solanum chacoense: identification of an SBP1 (RING finger protein) orthologue*. Sexual Plant Reproduction, 17: 81-87.

**Qiao, H., H. Wang, L. Zhao, J. Zhou, J. Huang, Y. Zhang and Y. Xue** (2004a), *The F-Box Protein AhSLF-S2 Physically Interacts with S-RNases That May Be Inhibited by the Ubiquitin/26S Proteasome Pathway of Protein Degradation during Compatible Pollination in Antirrhinum*. The Plant Cell, 16: 582-595.

**Qin, X., D. Luu, Q. Yang, O. Maes, D. Matton, D. Morse and M. Cappadocia** (2001), *Genotype-dependent differences in S12-RNase expression lead to sporadic self-compatibility in Solanum chacoense*. Plant Molecular Biology, 45: 295-305.

**Safavian, D. and J. S. Shore** (2010), *Structure of styles and pollen tubes of distylous Turnera joelii and T. scabra (Turneraceae): are there different mechanisms of incompatibility between the morphs?*, Sexual Plant Reproduction, 23: 225-237.

**Schlupmann, H., A. Bacic and S. M. Read** (1994), *Uridine Diphosphate Glucose Metabolism and Callose Synthesis in Cultured Pollen Tubes of Nicotiana alata Link et Otto*. Plant Physiology, 105: 659-670.

**Shiba, H., S. Takayama, M. Iwano, H. Shimosato, M. Funato, T. Nakagawa, F. S. Che, G. Suzuki, M. Watanabe, K. Hinata and A. Isogai** (2001), *A pollen coat protein, SP11/SCR,*

*determines the pollen S-specificity in the self-incompatibility of Brassica species.* Plant Physiology, 125: 2095-2103.

**Shimosato, H., N. Yokota, H. Shiba, M. Iwano, T. Entani, F.-S. Che, M. Watanabe, A. Isogai and S. Takayama** (2007), *Characterization of the SP11/SCR high-affinity binding site involved in self/nonself recognition in Brassica self-incompatibility.* The Plant Cell, 19: 107-117.

**Sijacic, P., X. Wang, A. L. Skirpan, Y. Wang, P. E. Dowd, A. G. McCubbin, S. Huang and T. H. Kao** (2004), *Identification of the pollen determinant of S-RNase-mediated self-incompatibility.* Nature, 429: 302-305.

**Sims, T. L., M. McGee, R. F. Williams, A. L. Myers, L. Tracey, J. B. Hamner, C. Ng, J. Wu, M. W. Gaber, B. McCarville, A. C. Nathwani and A. M. Davidoff** (2010), *IFN-beta restricts tumor growth and sensitizes alveolar rhabdomyosarcoma to ionizing radiation.* Molecular Cancer Therapeutics, 9: 761-771.

**Smalle, J. and R. D. Vierstra** (2004), *The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway.* Annual Review Plant Biology, 55: 555-590.

**Steer, M. W. and J. M. Steer** (1989), *Pollen tube tip growth.* New Phytologist, 111: 323-358.